

**DIE ISOLERING EN IDENTIFISERING VAN DIE
HONDAFWERENDE FAKTOR IN DIE KUTIKULÊRE
AFSKEIDING VAN DIE GEELHONDEBOSLUIS,
*HAEMAPHYSALIS LEACHI***

deur

BRENDA MARX

Tesis ingelewer ter voldoening aan die vereistes vir die graad van

Magister in die Natuurwetenskappe



Universiteit van Stellenbosch

Suid-Afrika

Promotor: Professor B.V. Burger

Stellenbosch

Mede-promotor: Doktor M. le Roux

Desember 2004

VERKLARING

Ek, die ondergetekende, verklaar hiermee dat die werk in hierdie tesis vervat, my eie oorspronklike werk is en dat ek dit nie vantevore in die geheel of gedeeltelik by enige universiteit te verkryging van 'n graad voorgelê het nie.

Brenda Marx

Datum

OPSOMMING

Honde toon duidelike tekens van afkeer of selfs naarheid wanneer hulle in noue kontak kom met die afskeiding van 'n sekere bosluisspesie, die geelhondebosluis, *Haemaphysalis leachi*. Daar word aangeneem dat die bosluis die afskeiding produseer om te verhoed dat die hond dit met sy bek van sy liggaam verwyder. Hierdeur word die oorlewingskanse van die bosluis verbeter.

'n Studie is gemaak van die samestelling van die vlugtige komponente van hierdie afskeiding om die chemiese verbindings, wat verantwoordelik is vir die afweer van honde, te identifiseer.

As gevolg van die sensitiwiteit van 'n hond se reuksintuig, is dit vir die bosluis nodig om slegs uiters klein kwantiteite van hierdie afweerstof af te skei, wat die waarneming van die verskillende komponente deur middel van konvensionele GC-metodes baie bemoeilik het. Ten einde die mees effektiewe metode te vind wat 'n gepaste hoeveelheid monster vir waarneming op 'n gaschromatograafdetektor sou verseker, is verskeie monsternemings en -verrykingsmetodes ondersoek, naamlik oplosmiddel-ekstraksie, SPME-monsterverrykingsmetodes, adsorpsie op aktiewe koolstof, kriopresipitasie, sorpsie in 'n fase-belaagde oopbuisval en oplosmiddellose monsterneming,

Twee monsternemingsmetodes het aanvaarbare resultate gelever: Met die eerste metode is geïrriteerde wyfiebosluise met dichlorometaan afgespoel en die ekstrak is na indamping met behulp van monsterinspuiting sonder inlaatstroomverdeling deur middel van GC-MS geanaliseer. Met die tweede metode is die afskeiding van geïrriteerde bosluise met mikroglasveselpapier afgegee en die papier is direk in die binnebuis van die inlaat van die GC-MS-sisteem geplaas, waar die vlugtige komponente termies gedesorbeer is vir gaschromatografiese skeiding en massaspektrometriese waarneming.

Om die aktiwiteit van die geïsoleerde materiaal te evalueer, is van lewende honde gebruik gemaak, om vas te stel of hulle aversie teenoor die betrokke monsters toon. Die ekstrak is in verskillende fraksies geskei, wat weer in subfraksies verder geskei is. Alle fraksies is na elke skeidingsproses getoets vir effektiwiteit om vas te stel watter van die fraksies die aktiewe verbindings bevat. Sodoende is die aantal moontlikhede vir die teikenverbinding met elke skeidingstap verminder. Daar is gevind dat 'n reeks aldehyede, naamlik heksanaal, heptanaal, oktanaal, dekanaal, undekanaal en dodekanaal, gesamentlik verantwoordelik is vir die afweer van honde.

Insekte en soogdiere skei dikwels semioverbindinge in 'n draermateriaal af om daardeur meer langdurige werking te verseker. In hierdie ondersoek is dus ook 'n begin gemaak met die identifisering van die ander verbindings wat in die besonder komplekse kutikulêre afskeiding van hierdie bosluisspesie aanwesig is.

SUMMARY

When in close contact with the Yellow Dog Tick, *Haemaphysalis leachi*, dogs show clear signs of disgust or even nausea. It is accepted that the secretion is produced by the tick in order to prevent the dog from removing the tick from its body with its teeth, thereby increasing the chances for the tick's survival.

The composition of this secretion was studied in order to identify the chemical compounds responsible for the repellent action of the secretion.

Because of the dog's keen sense of smell, the tick only needs to produce minute quantities of this repellent, which significantly complicated the detection of the different components by conventional GC-methods. Several sampling and sample enrichment methods were explored, including solvent extraction, SPME sample enrichment, adsorption on active charcoal, cryoprecipitation, sorption in a phase-coated open tubular trap, as well as solventless sampling, in order to determine which method would ensure an appropriate amount of sample for gas chromatographic detection.

Two of these sampling methods yielded acceptable results: The first method consisted of rinsing irritated female ticks with dichloromethane and, after concentrating the sample by evaporation, GC-MS analysis using normal splitless injection. The second method entailed collecting secretions by wiping irritated ticks with glass microfibre filter paper after which the paper was inserted directly into the inlet liner of the GC-MS system, where thermal desorption of the volatile constituents of the secretion preceded gas chromatographic separation and mass spectral detection.

Live dogs were needed for the evaluation of the isolated material to determine whether the samples had an aversive effect on them. The extract was separated into different fractions, which were further separated into subfractions. After each separation process, all the fractions were tested for efficacy in order to determine which fraction contained the active components, narrowing down the number of

candidate target compounds. It was concluded that a combination of aldehydes, namely hexanal, heptanal, octanal, nonanal, decanal, undecanal and dodecanal, is responsible for the dog repelling action of the secretion.

In most cases the semiochemicals of insects and mammals are secreted in a more complex matrix to ensure prolonged activity. For this reason some of the other compounds in the complex cuticular secretion of this tick species were also identified during the course of this study.

BEDANKINGS

Hiermee wil ek my opregte dank en waardering aan die volgende persone en instansies uitspreek:

- Prof. Ben V. Burger, vir leiding, bystand en geduld tydens die navorsing. Dankie ook vir die tegemoedkomeendheid en die geleentheid om bietjie werksondervinding op te doen in die middel van my navorsing. Die beste promotor ooit!
- Dr. Maritha le Roux, vir bystand, ondersteuning, geselsies en proeflees van die tesis. Die beste medepromotor ooit!
- Wina Burger, vir ondersteuning en aanmoediging, koek en teetee, en dat tannie en Prof. my soos een van die familie laat voel.
- Dr. C. Meyer en Prof. I. Green, vir die optree as eksaminatore.
- Stellenbosch Dierebeskermingsvereniging, Dr. Potgieter en al die hondeskutte in die omgewing, vir die versamel van bosluise.
- Vir finansiële bystand: NRF, Prof en my ouers.
- My ouers, familie en vriende, vir belangstelling, ondersteuning en motivering.
- Benhardi, vir liefde, motivering, aanmoediging, bystand, geselskap en bo alles ook geduld.
- My medestudente in LECUS, vir bystand, vriendskap en goeie tye.
- Al die honde en hul eienaars, vir hulpvaardigheid, ywerigheid, belangstelling en behulpsaamheid tydens die evaluering van die toetsmateriaal.
- My Skepper en Hemelse Vader vir die talente en voorreg om my lewe te kon lei tot waar ek nou is, genade en ontelbare seëninge.

INHOUD

Hoofstuk 1

Inleiding en Doelstelling

1.1	Algemene Inleiding	1
1.2	Produksie van Semioverbindings	5
1.3	Waarneming van semiochemikalieë	7
1.3.1	Kenmerke van Semioverbindings	7
1.3.2	Waarneming van Chemiese Stimuli	8
1.3.2.1	Die Anatomie van die Neus van die Soogdier	8
1.3.2.2	Die Sentrale Kamer	9
1.3.2.3	Die Algemene Chemiese Gewaarwording	10
1.4	Semiochemiese Kommunikasie in Bosluise	12
1.5	Klassifikasie van Bosluise	12
1.6	Doelstelling van Hierdie Studie	13
	Verwysings: Hoofstuk 1	15

Hoofstuk 2

Die Geelhondebosluis, *Haemaphysalis leachi*

2.1	Biologiese Belangrikheid van Bosluise	18
2.2	Voorkoms van <i>Haemaphysalis</i>	19
2.3	Lewensgeskiedenis	20
2.4	Fisiese Kenmerke van <i>Haemaphysalis</i>	24
2.4.1	Chemiese Samestelling van die Kutikula	26

2.5	Onderskeid Tussen Mannetjies en Wyfies	27
2.6	Beheer van Bosluisgetalle	27
2.7	Bosluiise op Honde	33
	Verwysings: Hoofstuk 2	35

Hoofstuk 3

Eksperimenteel

3.1	Algemeen	37
3.2	Versameling en Ekstraksie van Materiaal	37
3.3	Instrumentasie	38
3.3.1	GC en GC-MS	38
3.3.1.1	Monsterinlaat met Inlaatstroomverdeling	39
3.3.1.2	Monsterinlaat sonder Stroomverdeling	39
3.4	Monsternemingsmetodes	40
3.4.1	Oplosmiddelekstraksie van Afskeiding	40
3.4.2	Monsterverryking met Behulp van SPME	40
3.4.3	Monsterverryking deur Adsorpsie op Geaktiveerde Koolstof	40
3.4.4	Kriopresipitasie van Vlughtige Komponente	41
3.4.4.1	Afkoeling met Droë Ys	41
3.4.4.2	Afkoeling met Vloeibare Stikstof	42
3.4.5	Monsterverryking deur Sorpsie in 'n Fase-Belaagde Oopbuisval	43
3.4.6	Oplosmiddellose Monsterneming	43
3.5	Isolering van Aktiewe Materiaal	44
3.5.1	Preparatiewe Kapillêre Gaschromatografie	44
3.6	Biologiese Evaluering	45
3.6.1	Vorbereiding van Ekstrakte vir Toetse op Honde	45
3.6.2	Toetse van Individuele Fraksies op Honde	46
3.6.3	Toets van Sintetiese Mengsel	47

3.7	Sinteses	47
3.7.1	Aldehiede: Heptanaal, Nonanaal, Dekanaal	48
Verwysings: Hoofstuk 3		51

Hoofstuk 4

Resultate en Bespreking van Verskillende Monsternemingsmetodes en Toetse op Honde

4.1	Monsterverryking met behulp van SPME	52
4.2	Monsterverryking deur Adsorpsie op Geaktiveerde Koolstof	54
4.3	Kriopresipitasie van Vlugtige Komponente	57
4.4	Monsterverryking deur Sorpsie in 'n Fase-Belaagde Oopbuisval	58
4.5	Oplosmiddelvrye Monsterinlaatmetodes	61
4.6	Monsterinspuitmetodes	62
4.7	Gevolgtrekkings Aangaande Monsternemingsmetodes	63
4.8	Eksperimente met Ekstrakte van die Kutikulêre Afskeidings	65
4.8.1	Eksperimente met Fraksies van die Kutikulêre Afskeidings	66
4.8.2	Resultate van die Toets van die Sintetiese Mengsel	68
Verwysings: Hoofstuk 4		71

Hoofstuk 5

Identifisering van Komponente van die Kutikulêre Afskeiding van *Haemaphysalis leachi*

5.1	Aldehiede: Onvertak	73
------------	----------------------------	-----------

5.2	Aldehiede: Vertak	77
5.3	Alkohole: Furfurielalkohol (2-Furaanmetanol)	78
5.4	Alkohole: 2-Metiel-2-butanol	81
5.5	Alkohole: 2-Metiel-3-buten-2-ol	83
5.6	Karboksielsure: Versadig	84
5.7	Karboksielsure: Onversadig	89
5.8	Metielbutanoon	90
5.9	2-Chloro-2-metielbutaan	91
	Figure: Hoofstuk 5	94
	Verwysings: Hoofstuk 5	110

Hoofstuk 1

Inleiding en Doelstelling

1.1 Algemene Inleiding

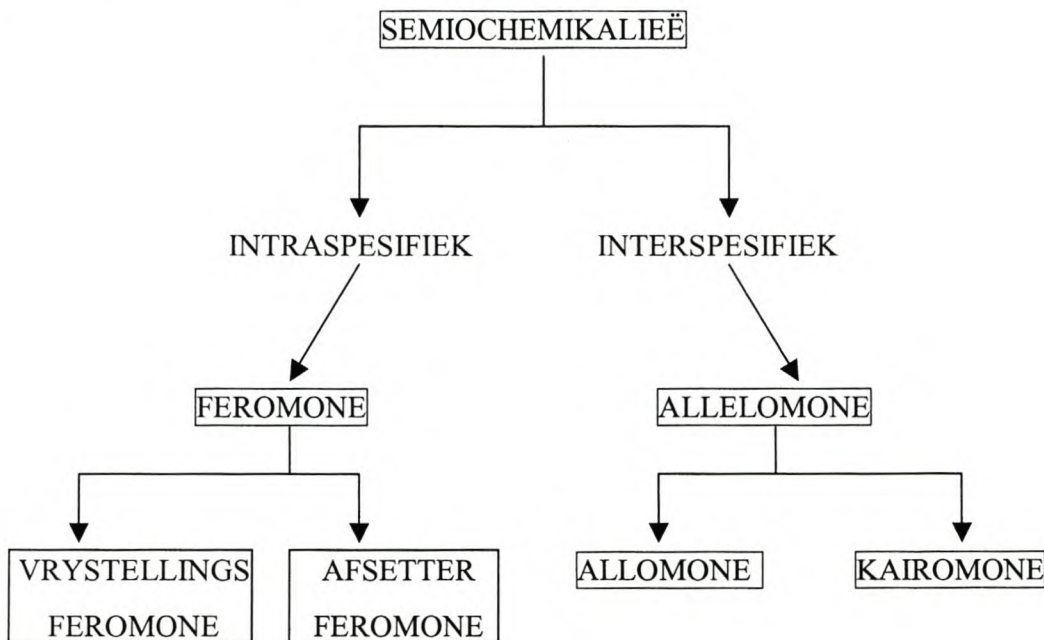
Die belangrikste vorm van kommunikasie tussen diere vind op 'n chemiese basis plaas, deur middel van verbindings wat as semiochemikalieë bekend staan. Die term *semiochemikalie* is afgelei van die Latyn *semion*, wat *sein* beteken¹. Semiochemiese kommunikasie (die gebruik van chemiese middels om boodskappe oor te dra) het reeds vanaf so vroeg as 1837 die belangstelling van wetenskaplikes, bioloë en chemici geprikkel², hoogs waarskynlik as gevolg van die belangrikheid van kommunikasie, ook vir die mens. Die algehele sosiale struktuur van die wêreld is gegrond op kommunikasie, en nuwe kommunikasiemedie word voortdurend ontwikkel met die vordering van die moderne tegnologie.

Vandat die nut van biologiese plaagbeheer in landboukunde besef is, het die aanwending van semiochemikalieë om peste te bestry ook praktiese belangstelling op gebiede soos die agronomie, tuinboukunde, entomologie, plantpatologie, landbou-ekonomie, bosbou, landbou-ingenieurswese, dierkunde en veeteelt gaande gemaak³.

Vanaf die 1950's het die ontwikkeling van analitiese metodes in organiese chemie dit moontlik gemaak om klein hoeveelhede onbekende verbindings te identifiseer⁴. Die eerste identifisering van die sekslofstof van 'n insek is egter eers in 1959 gerapporteer⁵, omdat hierdie semiochemikalieë meestal in sulke klein kwantiteite en konsentrasies afgeskei word dat hulle isolering en identifisering uiters sensitiewe metodes vereis. Met die verbetering van analitiese tegnieke en sensitiwiteit van instrumentasie, is daar vandag letterlik duisende semiochemikalieë geïdentifiseer in soogdiere, insekte, amfibieë, voëls, reptiele, geleedpotiges en ook ander organismes.

Die funksies van hierdie semiochemikalieë sluit in die oordrag van boodskappe in verband met voedselopsporing, verdediging, seksuele aantrekking⁶, byeenkoms of aggregasie⁷, gevaar⁸, spesie-herkenning⁹, sosiale organisasie¹⁰ en territorialiteit¹¹.

Semiochemikalieë sluit beide vlugtige en nie-vlugtige semioverbindings in en word verder gesubklassifiseer soos opgesom in Figuur 1.1.



Figuur 1.1. Opsomming van die klassifikasie van semiochemikalieë.

Intraspesifieke chemiese kommunikasie, met ander woorde tussen individue van dieselfde spesie, vind plaas met behulp van semiochemikalieë genaamd *feromone* (*pherein*, om te dra en *horman*, om te prikkel)^{12,13}.

Die term *allelomone*^{14,15} is die versamelnaam vir interspesifieke (tussen lede van verskillende spesies) semiochemikalieë.

Feromone word verder onderverdeel in *vrystellers* en *afsetters*¹⁶. Vrystellers is verantwoordelik vir onmiddellike gedragsreaksies, terwyl afsetters (aanwakker-feromone)

‘n meer langtermyn fisiologiese effek op die ontvanger het¹⁷ en amper as ‘n inter-individuele hormoon beskou kan word.

Die feromoon wat deur manlike sprinkane afgeskei word en die geslagsrypheid van die onvolwasse sprinkane versnel sodat voortplanting van die sprinkane gesinkroniseerd kan plaasvind en sprinkaanswerms gevorm kan word, is ‘n voorbeeld van ‘n afsetterferomoon¹⁸. Die enigste bekende voorbeeld van afsetterferomone by bosluise is die vrugbaarheidverminderingsferomoon in *Argas arboreus*, waar die vrugbaarheid van wyfies met tot 98% afneem wanneer hulle in groot getalle naby mekaar verkeer³¹.

Vir die voortbestaan van elke dierspesie is voortplanting onontbeerlik. Een van die primêre funksies van feromone is dus die opsporing van ‘n maat. Dikwels word die feromone deur die wyfie afgeskei en word die mannetjie daardeur geprikkel. Baie navorsing is al gedoen oor die sekslofstof-feromone van talle insekte, Arachnida (spinagtiges), voëls, soogdiere en reptiele. Die afskeiding deur die wyfie Rhesus Aap, *Macaca mulatta*, van ‘n mengsel van asynsuur, propioonsuur, *iso*-bottersuur, bottersuur en *iso*-valeriaansuur, onder beheer van vroulike hormone, is ‘n voorbeeld van hierdie tipe feromoon by soogdiere. Die teenwoordigheid van hierdie verbindings is noodsaaklik vir paringsgedrag by mannetjies¹⁹.

Die beheer van reprodktiewe gedragspatrone deur feromone is die mees algemene metode van chemiese kommunikasie²⁰, maar feromone word byvoorbeeld ook as lokstowwe gebruik om vir ander lede van dieselfde spesies die posisie van voedselbronne aan te dui. Die miskruier, *Kheper lamarki*, skei byvoorbeeld ‘n feromoon af wanneer hy naby ‘n mishoop kom. Dit lok ander miskruiers van dieselfde spesie aan (aggregasie-funksie).²¹ Seleksie van ‘n geskikte paringsmaat vind dan normaalweg in of by die mishoop plaas.

Chemiese kommunikasie is veral van besondere belang by sosiale insekte. Alarmferomone is algemeen by termiete, miere en bye, waar die teenwoordigheid van oortreders of lede van ander neste verklap word. Lede van dieselfde nes kan mekaar ook uitken deur middel van feromone, en miere en termiete maak van voetspoor-feromone gebruik om die roete na ‘n voedselbron aan te dui.

Die enorme potensiaal van insekferomone om peste te beheer is welbekend. Interspesifieke interaksies in insekte kan beheer en gebruik word om die onbeperkte aanwas van insekte tot plaagafmetings, soos wat dikwels gebeur as monokultuur-landboupraktyke toegepas word, te beperk²⁰.

Daar is gevind dat, hoewel dieselfde verbinding of mengsel van verbindings soms deur verskillende spesies as sekslokstof gebruik word, die feromoon in verskillende spesieverwante konsentrasies afgeskei word, en dat elke spesie vir die samestelling of relatiewe konsentrasie van sy eie spesie sensitief is. 'n Voorbeeld hiervan is 2,6-dichlorofenol in die twee bosluisspesies *Hyalomma dromedarii* en *Hyalomma anatolicum excavatum*. Optimale sekslokstofwerking by *H. dromedarii* is eers waargeneem met dubbel die 2,6-dichlorofenolkonsentrasie as wat by *H. anatolicum excavatum* vir dieselfde effek nodig is. Terselfdertyd word by twee ander bosluisspesies, *Dermacentor variabilis* en *Dermacentor andersoni*, nie gediskrimineer tussen die konsentrasies van 2,6-dichlorofenol oor 'n wye konsentrasie-spektrum nie.²²

Allelomone (*allelo* = gemeenskaplik²⁰) word gesubklassifiseer in *allomone* en *kairomone*. Kairomone bevoordeel die ontvanger, bv. 'n afstootlike reuk wat vir 'n roofdier aandui dat sy potensiële prooi giftig is. Allomone bevoordeel weer die afsender. Dit sluit die afweer van predatore, verwarring van prooi en bemiddeling van simbiotiese interaksies in. Kennis van verdedigings-allomone dateer terug tot die 19^e eeu³.

Allomone

Afweerstowwe word dikwels in die vorm van druppels op die liggaamsoppervlak afgeskei, en in sommige gevalle na die vyand gespuet. Die verdedigingsafscheidings van baie insekte bevat klein reaktiewe molekules wat, in sommige gevalle, giftig kan wees vir lewende weefsel. Kortkettingsure, bv. mieresuur of asynsuur, afgeskei deur miere, kewers en ruspes, veroorsaak koagulasie van proteïene en irriteer prikkelbare weefsels van die aanvaller. Reaktiewe aldehyede bind geredelik aan proteïene, en is pynlike traangasse vir mense en diere. Dit word onder andere afgeskei deur stokinsekte, kakkerlakke en kewers.

Bensokinoon, wat proteïene bind, kom algemeen voor in afweerstowwe van kewers en duisendpote.

Sommige afscheidings dien as beide allomone en feromone, byvoorbeeld by termiete, waar hul afweermiddel teen aanvallers ook dien as alarmsein vir die ander termiete in die nes.

Allomone dien egter nie noodwendig slegs as afweerstowwe nie. Soms is die vlugtige liggaamslipiede op predatoriese insekte baie soortgelyk aan die liggaamsreuke van die lede van 'n kolonie, en word die indringer ongehinderd die nes ingelaat. Dwaalkewerspesies van die genus *Anolytus* skei 'n middel op die abdomen af wat deur miere geëet word. Die verwarde mier sien dit as kos aan en dra die kewer die nes in. Gaasvlerklarwes (Familie Chrysopidae) beweeg vryelik in termietnesgange, nader die termietwerkers en skei 'n gasagtige verlamningsmiddel af. Die werkers word dan geïmmobiliseer en deur die larwes opgeëet. Die Bolas spinnekop, *Cladomelea longipes*, vang sy prooi deur, in plaas van 'n web, 'n druppeltjie aan 'n enkele spinnerakdraadjie rond te swaai. Die druppeltjie bevat onder andere die sekslokstowwe van twee motspesies, wat hul na die draadjie aantrek en die spinnekop in staat stel om hul te vang. 'n Interessante verskynsel is dat die twee motspesies op verskillende tye gedurende die nag aktief is, en dat die samestelling van die feromone in die druppeltjie wat deur die spinnekop afgeskei word, daarvolgens verskil³⁰.

Allomone kan ook simbiose tussen insekte en mikroörganismes bevorder. Blaarsnyermiere laat slegs die groei van sekere bakterieë in die nes toe. Hulle doen dit deur allomone af te skei wat die spesiesamestelling van groeiende fungi reguleer. Die groei van kontaminerende spesies word deur hierdie spesie-spesifieke antibiotikum geïnhibeer.³

1.2 Produksie van Semioverbindinge

Die bron van chemiese kommunikasiemiddele is in die meeste gevalle die eksokriene kliere. Diere wat stowwe afskei wat dikwels weefselbeskadigend is, het verskeie maniere ontwikkel om hulself daarteen te beskerm:

- a) Hulle stoor hulle afskeidings in kutikulum-uitgevoerde reservoirs wat geïsoleer is van die res van die liggaam en die stowwe slegs na buite kan uitlaat.
- b) Skadelose voorgangers van die gifstowwe word in die sitoplasma van die sekretoriese selle gestoor. Die toksiene word dan op die oomblik van aanval geproduseer. Die klier reservoir bevat twee kompartemente. Die inhoud van die binneste kompartemente word afgeskei na die buitenste kompartemente wat reaktante en die nodige ensieme bevat. Sodra die voorgangermolekules die buitenste kompartement bereik, vind die reaksies plaas en gifstowwe word gevorm wat na buite gespuut word. Hierdie hele proses vind in 'n breukdeel van 'n sekonde plaas.
- c) In plaas daarvan dat die reaktante en ensieme reeds in die buitenste kompartemente gestoor is, word dit ook op die oomblik van aanval na die buitenste kompartement afgeskei, waarna dieselfde prosesse wat hierbo beskryf is, volg.

Baie onsmaklike en giftige insekte is aposematies (hulle het helderkleurige patrone) sodat die roofdier die slegte smaak met die helder patrone kan assosieer. Die helderkleurige koningvlinder, *Danaus plexippus*, is 'n voorbeeld hiervan. Hierdie insek maak egter nie gebruik van eksokriene kliere om die afweerstof af te skei nie. Die larwe van die koningvlinder leef onder andere van melkbosblare, wat die bron is van sekere glikosiede in die weefsels van die volwasse skoenlapper. Die volwasse vlinder het 'n uiters onaangename smaak vir voëls en ander roofdiere.³

Hoewel daar reeds navorsing gedoen is oor die feromone van bosluise, is daar baie min inligting beskikbaar oor die produksie en aanwending van allelomone, veral allomone, in ixodiede (harde) bosluise, wat die onderwerp van die huidige navorsing is.

1.3 Waarneming van Semiochemikalieë

Die oordrag van boodskappe deur middel van olfaktoriese stimuli is baie algemeen in die diereryk, onder andere ook by honde. Dit sluit informasie oor territorialiteit, sosiale status (by tropdiere) en reprodktiewe status in.²³

1.3.1 Kenmerke van Semioverbindings

As gevolg van so 'n ryke verskeidenheid van chemiese stimuli, veral in die natuur, is dit noodsaaklik dat elke spesie oor sy eie unieke feromone en ander semioverbindings moet beskik om dubbelsinnigheid en verwarring uit te skakel. Die molekules moet ook vlugtig genoeg wees sodat die boodskap oor 'n redelike afstand oorgedra kan word. Hoe groter die molekules, hoe groter is die kans vir die uniekheid van die sein, maar groot molekules (molekulêre massa \gg 300 g/mol) is weer meestal nie vlugtig genoeg nie. 'n Goue middeweg is molekules met 'n raamwerk van omtrent 7 - 20 koolstowwe, wat ook derivate van vetsure of aminosure insluit. Bombikol, *E,Z*-9,11-heksadekadien-1-ol, 'n sekslofstof wat deur die wyfiesywurmmot, *Bombyx mori*, afgeskei word, is waarskynlik die bekendste voorbeeld van so 'n feromoon. Soms word daar egter ook gebruik gemaak van 'n kombinasie van chemiese verbindings om 'n enkele boodskap oor te dra.



Bombikol, *E,Z*-9,11-heksadekadien-1-ol.

1.3.2 Waarneming van Chemiese Stimuli

Die drempelwaarde vir die waarneming van chemiese stimuli is vir 'n hond in die orde van 100 tot selfs 1 miljoen keer laer as vir die mens, afhangende van die tipe chemikalie verantwoordelik vir die sein. Deur vergelyking van 'n 50 cm^3 lugteug van 'n mens met 'n 50 cm^3 lugteug van 'n hond, byvoorbeeld, is daar gevind dat die drempelwaarde vir α -jonoon 1.2×10^{10} molekules is vir 'n mens en 5.0×10^6 vir 'n hond, met 'n mens/hond verhouding van $2,4 \times 10^3$. In 'n latere studie is egter gevind dat die verhouding tussen die drempelwaarde vir α -jonoon vir mense teenoor honde omtrent 300 is, dit wil sê ongeveer 10 maal minder as die voorafgerapporteerde waardes²⁴. Vir bottersuur is die drempelwaarde vir 'n mens 5.0×10^{11} molekules per teug en 4.5×10^5 vir honde (mens/hond verhouding = 1.1×10^6).

Vir sommige chemikalieë is die menslike neus nogtans meer sensitief as selfs die sensitiefste detektor verkrygbaar.

1.3.2.1 Die Anatomie van die Neus van die Soogdier

Die neuskanale word verdeel deur 'n septum, sodat twee kanale vir informasie beskikbaar is vir die waarnemer. Vermoedelik help dit met die lokalisering van die rigting waarvandaan die reuk afkomstig is. Figuur 1.3 is 'n voorstelling van die nasale kanale, insluitend die neusskulp, olfaktoriese area met olfaktoriese epiteel, en die olfaktoriese lob.²⁵

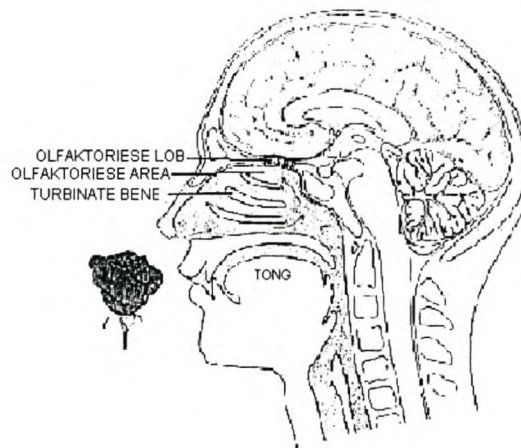
Die nasale opening bestaan uit drie dele:

Voorste (anterior) nasale kanaal

Sentrale kamer

Agterste (posterior) nasale kanaal

Die voorste nasale kanaal sluit die asemhalingsopening in. Die sentrale kamer bevat die olfaktoriese epiteel (Figuur 1.4) en olfaktoriese reseptore. Die agterste nasale kanaal is die area waardeur ingeasemde lug na die nasofarinks (area tussen die neus- en keelholtes) beweeg vir respirasie.



Figuur 1.3. Die nasale opening en neusholte van 'n soogdier, soos voorgestel in die geval van die mens.

1.3.2.2 Die Sentrale Kamer

Die sentrale kamer is die gedeelte waar die olfaktoriese epiteel en reseptore gehuisves word. Die epiteel is 'n dun weefsellaag (omtrent 75 μm dik) en bestaan hoofsaaklik uit 3 tipes selle: *Reseptorselle*

Ondersteunende (sustentakulêre) selle

Basale selle

Die epiteel word bedek deur 'n slymlaag (mukosa) wat deur die ondersteunende selle asook Bowman se kliere (kliere gevorm in die *lamina propria* wat die epiteel deurdring) afgeskei word. Die slymbedekte epiteel staan bekend as die *olfaktoriese mukosa*. Die basale selle vorm 'n basismembraan wat die epiteel van die lamina

propria (die subepiteelweefsel laag van digte bindweefsel waar Bowman se kliere, olfaktoriese aksonbundels en bloedvate te vinde is) bevat.

Die olfaktoriese reseptorselle is bipolar (een reseptorpool en een senderpool) en word omring deur ondersteunende selle. Die dendriete (reseptorpool uitsteeksels) strek vanaf die mukosa tot 'n verdikking op die reseptorsel: die olfaktoriese uitstulping (dendrietiese knop) op die epiteeloppervlak.

Olfaktoriese uitstulpings is met silia bedek, wat 'n groter interaksie-oppervlak met molekules voorsien. Dit is nie bekend of die silia ook olfaktoriese reseptorpunte het nie.

Die aksons (boodskap-uitsendingspool uitsteeksels) strek vanaf die reseptorsel tot die olfaktoriese node (knoop), waar dit oor 'n sinaps met sekondêre neurone verbind is en boodskappe verder gelei word.

Hierdie reseptorselle degenerer en bestaan slegs vir 'n paar dae, maar hulle regenerer baie vinnig. Mens het in die orde van omtrent 10 miljoen olfaktoriese reseptorselle, terwyl honde meer as 200 miljoen het. Dit verduidelik ook die veel hoër sensitiviteit van die hond se reuksintuig en reuk waarnemingsdrempel teenoor dié van die mens.^{25,26}

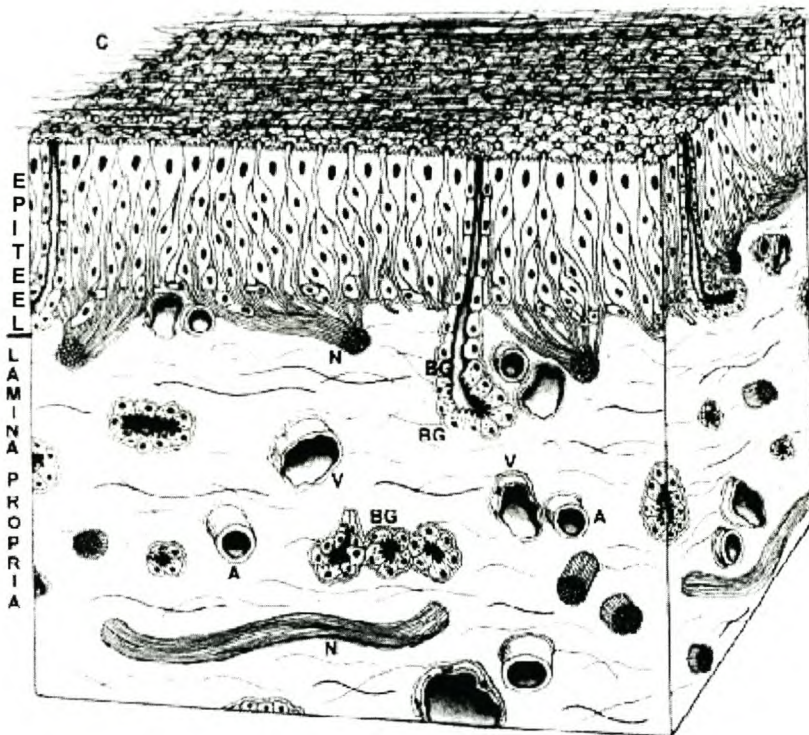
1.3.2.3 Die Algemene Chemiese Gewaarwording

Buite die olfaktoriese area van die mukosa word die olfaktoriese epiteel vervang met kolom-epiteel. Hier word vrye senu-eindpunte gevind wat verband hou met reaksies wat plaasvind as gevolg van irriterende chemiese stowwe. Hierdie senuwees sluit aan by die senuvesels vanaf ander areas op die gesig en kop in die vyfde kraniale senuwee, saam met die olfaktoriese neurone.

Die term *chemestese* word gebruik om die sensasies wat ontstaan as gevolg van chemiese stimulasie van vrye senu-eindpunte²⁷, te beskryf. Die brandende sensasie van sure of irritasie van die neus as gevolg van skadelike chemiese dampe is voorbeelde hiervan. Dit kan dus beskryf word as 'n *algemene chemiese gewaarwording* van irriterende, skadelike chemiese stimuli soos waargeneem deur

die sensoriese sisteem as gevolg van die irritasie wat gepaardgaan met blootstelling van die mukusmembrane aan skadelike chemikalieë²⁸.

Al word hierdie stimuli nie geklassifiseer as “reuke” nie, word hulle steeds meestal deur die neus ervaar, as gevolg van die reaksie met die mukusmembraan buite die olfaktoriese area, en kan deur die waarnemer as olfaktoriese stimuli geïnterpreteer word.



Figuur 1.4. Diagram van die olfaktoriese mukusmembraan, wat ook silia (C), Bowman se kliere (BG), olfaktoriese aksonbundels (N), are (V) en slagare (A) aandui.

1.4 Semiochemiese Kommunikasie in Bosluise

Die meeste semiochemiese inligting wat oor bosluise bekend is, is beskikbaar gestel deur navorsers in die VSA, waar ander bosluisspesies as in Afrika voorkom. 'n Relatief algemene seksferomoon van Amerikaanse bosluisspesies is 2,6-dichlorofenol, wat dieselfde funksie in Afrika-genera soos *Amblyomma* het. Ekstrakte van *Haemaphysalis leachi*, die fokusspesie van hierdie studie, bevat egter geen 2,6-dichlorofenol nie.

Bosluise word na hul gashere gelok deur liggaamsreuke en liggaamstemperatuur, asook vibrasies in die grond wat veroorsaak word deur groot soogdiere wat rondbeweeg en ook vibrasies van die plante waarteen die aankomende diere skuur, lugstrome wat veroorsaak word deur die beweging van die aankomende dier, onderbreking van ligstrale (skaduwee) en die vogtigheid van uitgeasemde lug.

1.5 Klassifikasie van Bosluise

Bosluise word as volg geklassifiseer:

Superryk: Eukaryotae

Ryk: Animalia

Phylum: Arthropoda

Groep: Chelicerata

Klas: Arachnida

Orde: Acari

Suborde: Metastigmata

Familie: Ixodidae

Lede van die phylum *Arthropoda* het 'n chitienagtige eksoskelet en geledede ledemate. Die liggaam is gesegmenteerd. By bosluise het die segmentasie egter verlore gegaan. Ander

basiese kenmerke sluit in: 'n ventrale geganglioneerde senuweestring en 'n dorsale buisvormige hart met 'n oop sirkulasiesisteem.

Chelicerata het reeds in die vroeë stadia van evolusie hul antennas verloor. Die monddele bestaan uit *chelicerae* (knyperagtige kake, giftande of boororgane). Direk agter die *chelicerae* word *pedipalpe* aangetref. Pedipalpe kom soms voor as ledemate, maar verrig ook ander funksies. Die vier pare bene is te vinde agter die pedipalpe. Hierdie strukture groei uit 'n vergroeide kop en toraks (*prosoma*). Die oorblywende segment word die abdomen (*metastoma*) genoem.²⁹

1.6 Doelstelling van Hierdie Studie

Daar is opgemerk dat die geelhondebosluis, *Haemaphysalis leachi*, honde van verskillende soorte kan afweer deur semiochemikalieë (allomone) af te skei wat 'n merkbare naarmakende effek op honde tot gevolg het.

Tot dusver is daar oor die semiochemikalieë van *H. leachi* skynbaar nog niks bekend nie, en spesifiek is daar geen inligting oor hierdie bosluis se seksferomoon en verdedigingsafskeidings beskikbaar nie.

Dit is egter bekend dat honde wat binne ruikafstand van geïrriteerde *Haemaphysalis leachi* bosluise (veral volgesuigde wyfies) gebring word, tipiese tekens van naarheid toon soos die oormatige afskeiding van speeksel (kwyl), in die lug byt en pogings om gras te eet. Dieselfde tekens word waargeneem wanneer die honde die bosluis in hul monde kry. Hierdie tekens hou slegs vir 'n kort periode aan (minder as 'n minuut) nadat die bosluis uit die hond se olfaktoriese bereik geneem word.

In 'n voorlopige ondersoek is daar gevind dat, wanneer die bosluise versteur word, miniatuur sweetagtige druppeltjies op die agterlyf waargeneem kan word. Daar word aangeneem dat hierdie afskeiding verantwoordelik is vir die afwerende effek op honde.

Hierdie afweerstof sou die bosluis se kans op oorlewing kan verbeter aangesien 'n hond dit onmoontlik of ten minste uiters onaangenaam vind om 'n bosluis met sy tande van sy lyf te verwyder.

Die doel van hierdie studie is die bepaling van die chemiese samestelling van hierdie afskeiding met die oog op die identifisering van die verbinding(s) wat die bosluis vir sy verdediging teen honde gebruik. Omdat dit bekend is dat insekte en soogdiere hulle semioverbindings dikwels in 'n draermateriaal (substraat) afskei om daardeur meer langdurige werking te verseker, is in die huidige ondersoek ook aandag gegee aan ander verbindinge wat in die afskeiding voorkom. Slegs wyfies is tydens hierdie studie gebruik aangesien hul veel groter is as die mannetjies en dus makliker hanteer kon word. Dit is dus nie bekend of die mannetjies ook die afweerstof afskei nie. Verskeie metodes van versameling van die afskeidings, monstervoorbereiding, analise en isolering van die aktiewe komponente van die afskeiding is ondersoek en word in hierdie tesis bespreek.

Verwysings: Hoofstuk 1

1. F.E. Regnier, *Biol. Reprod.* **4**:309 (1971).
2. C.T. Siebold, *Arch. Anat. Physiol.* **1837**:381 (1837), Verwysing in M. Jacobson, "Insect Sex Attractants", Interscience Publishers, New York, p. 3 (1965).
3. C-H. Chou en G.R. Walker, "Allelochemicals and Pheromones", Institute of Botany, Academia Sinica, Taipei, p. x (1983).
4. H.E. Evans, "Insect Biology", Addison-Wesley Publishing Company, USA, pp. 114-140 (1984).
5. A. Butenandt, R. Beckmann, D. Stamm en E. Hecker, *Z. Naturforsch* **14**:283 (1959), Verwysing in "Insect Behaviour", R.W. Matthews en J.R. Matthews, John Wiley and Sons, New York, p. 193 (1978).
6. U.E. Brady en R.C. Daley, *Ann. Entomol. Soc. Am.* **65**:1356 (1972): Verwysing in K.W. Vick *et al.*, "Management of Insect Pests with Semiochemicals", red. E.R. Mitchell, Plenum Press, New York, p. 27 (1981).
7. M.C. Birch, *Am. Chem. Sci.* **66**:409 (1978): Verwysing in M.C. Birch, "Chemical Ecology of Insects", red. W.J. Bell en R.T. Cardé, Chapman and Hall, New York, p. 350 (1984).
8. L.R. Nault, L.J. Edwards en W.E. Styer, *Env. Ent.* **2**:101 (1973): Verwysing in L.R. Nault en P.L. Phelan, "Chemical Ecology of Insects", red. W.J. Bell and R.T. Cardé, Chapman and Hall, New York, p. 254 (1984).
9. J.W.S. Bradshaw en P.E. Hows, "Chemical Ecology of Insects", red. W.J. Bell en R.T. Cardé, Chapman and Hall, New York, p. 443 (1984).
10. R.M. Duffield, J.W. Wheeler en G.C. Eickwort, "Chemical Ecology of Insects", red. W.J. Bell en R.T. Cardé, Chapman and Hall, New York, pp. 387-428 (1984).
11. J. Stander, "Chemiese karakterisering van die preorbitale klierafskeiding van die steenbok, *Raphicerus campestris*, en die rooiduiker, *Cephalophus natalensis*", Ph.D Tesis, Universiteit van Stellenbosch, p. 20 (1992).
12. R.W. Matthews en J.R. Matthews, "Insect Behaviour", John Wiley and Sons, New York, p. 187 (1978).
13. P. Karlson en M. Luscher, *Nature* **183**:155 (1959).

14. R.H. Whittaker en P.P. Feeny, *Science* **171**:757 (1971).
15. E.S. Albone, "Mammalian Semiochemistry", John Wiley and Sons Ltd., New York, p. 4 (1984).
16. E.O Wilson en W.H. Bossert, *Rec. Progr. Hormone Res* **19**:673 (1963).
17. Verw. 13, p. 3.
18. Verw. 2, pp. 65-75.
19. D.M. Stoddart, "Mammalian Odours and Pheromones", Camelot Press Ltd., Southampton, p.10 (1976).
20. Verw. 2, p.29.
21. M. Röth, "Bepaling van die afweerstawwe van *Holopterna valga* en *Papilio demodocus* en die sekslofstof van *Khepher lamarcki*", MSc-tesis, Universiteit van Stellenbosch, pp.26-29 (1978).
22. R.M. Silverstein, J.R. West, D.E. Sonenshine en G.M. Khalil, *J. Chem. Ecol.* **9**:1543-1549 (1983).
23. J.J. Anisko, "Communication by Chemical Signals in Canidae", Verwysing in R.L. Doty, "Mammalian Olfaction, Reproductive Processes, and Behavior", Academic Press Inc., New York, pp. 283-293 (1976).
24. D.G. Moulton en D.A. Marshall, "Odour Detection in Dog and Man", 1st ECRO Congr., Paris, July 3 to 5 (1974), P. Laffort, *Arch. Sci. Physiol.*, **14**:75 (1963) en W. Neuhaus, *Z. Vgl. Physiol.*, **35**:527, (1953), Verwysings in R.H. Wright, "The Sense of Smell", CRC Press, Florida, p. 144 (1982).
25. T. Engen, "The Perception of Odours", Academic Press, Inc., New York, pp.17-34 (1982).
26. T.E. Finger, W.L. Silver en D. Restrepo, "The Neurobiology of Taste and Smell", 2^e uitg., Wiley-Liss, New York, pp. 131-140 (2000).
27. T.E. Finger, W.L. Silver en D. Restrepo, "The Neurobiology of Taste and Smell", 2^e uitg., Wiley-Liss, New York, pp. 73-100 (2000), Verwysing in B.G. Green, J.R. Mason, M.R. Kare, "Chemical Senses, Vol.2: Irritation", Marcel Dekker, New York, pp.361 (1990).
28. G.H. Parker, *J. Acad. Nat. Sci. Phila* **14**:221-234 (1912) en C.A. Keele (1962), *Arch. Int. Pharmacodyn* **139**:547-557, Verwysings in T.E. Finger, W.L. Silver en

- D. Restrepo, "The Neurobiology of Taste and Smell", 2^e uitg., Wiley-Liss, New York, pp. 73-100 (2000).
29. Verw. 3, pp. 413-419.
30. K.F. Haynes, *Chemoecology* **12**:19-105 (2002).
31. D.E. Sonenshine, "Biology of Ticks Volume 1", Oxford University Press, p. 357 (1991).

Hoofstuk 2

Die Geelhondebosluis, *Haemaphysalis leachi*

2.1 Biologiese Belangrikheid van Bosluise

Wanneer na *Arachnida* verwys word, kom spinnekoppe onmiddellik in die geestesoog na vore. Hoewel spinnekoppe baie meer sigbaar en waarneembaar as bosluise is, het hulle 'n wesenlik kleiner uitwerking op die gesondheid van mens en dier en op die ekonomie. Die gevaar van 'n paar giftige spinnekopspesies (byvoorbeeld die knopiespinnekop, *Latrodectus hesperus*) is veel kleiner as hul nut as natuurlike beheerders van vlieë en ander insekpeste.

Bosluiise is beide direk en indirek vir skade verantwoordelik. Direkte skade sluit in die aftakeling van die gesondheid van die gasheer as gevolg van bloedverlies, ongemak en bosluisvergiftiging.¹ Bosluisbytplekke kan ook gelokaliseerde inflammasie en infeksie veroorsaak indien velbakterieë by die voedingsposisie teenwoordig is. Dit gebeur as gevolg van die feit dat bosluise hul bloedmaaltye konsentreer deur afvalprodukte en limf deur middel van hul speekselkliere uit te skei en na die gasheer terug te voer terwyl daar steeds op die gasheer gevoed word.² In die geval van bosluisbesmetting van veediere, word die vel van die gasheer beskadig waar die bosluise aanheg en in die handel verlaag dit dus die gehalte van huide en velle.

Indirekte skade het meestal ernstiger gevolge. Bosluise dien as oordraers (vektore) vir verskeie mikroparasiete wat siektes in mense en diere veroorsaak. Infestering (parasietbesmetting) is meestal beperk tot 'n relatief klein geografiese area omdat spesifieke patogene deur spesifieke bosluis-en-gasheer-kombinasies oorgedra word. Die voedingsgewoontes van veelvuldige-gasheerbosluiise speel 'n groot rol in die oordrag van siektes.³

Haemaphysalis leachi is die enigste bekende vektor van die bakterieë *Babesia canis*, wat galkoors by honde veroorsaak⁴. Ander mikroörganismes, soos *Rickettsia conori* (veroorsaak bosluisbytkoors in mense), *Rickettsia rickettsii* (Rocky Mountain Spotted Fever) en *Coxiella burnetii* (veroorsaak Q-koors in mense en diere), word ook versprei deur *H. leachi*.⁵ Patogene word na die gasheer se liggaam oorgedra deur die afskeidings van die bosluis se speekselkliere.

Mense word selde deur die volwasse bosluise gebyt, hoewel die larwes van 'n paar spesies, insluitend *Rhipicephalus appendiculatus* en *Amblyomma hebraeum*, beide endemies aan Suider-Afrika, ywerig op mense voed. *H. leachi* verkies uitsluitlik karnivore, bv. huisdiere soos katte en honde, maar ook jakkalse en jaghonde.⁶ Larwes en nimfe verkies gewone veldknaagdiere, sowel as honde, frette en krimpvarkies.

Afgesien van die spesifieke probleme wat aan die infestering deur sekere spesies toegeskryf kan word, is bosluise verantwoordelik vir aansienlike addisionele kostes vir veeboere aangesien die arbeidsintensiewe dip- en ander pesbehandelingsprosedures tot hoër produksiekostes bydra.

2.2 Voorkoms van *Haemaphysalis*

Die genus *Haemaphysalis* (ooglose bosluise⁵) kom hoofsaaklik natuurlik in die Ou Wêreld voor, met slegs drie spesies in Nearktiese en Neotropiese streke. Ongeveer 155 spesies is bekend¹⁷. *Haemaphysalis leachi*, ook bekend as die Geelhondebosluis,⁷ is inheems in Suid-Afrika, Swaziland, Asië en Australië. In Suid-Afrika word hul hoofsaaklik in die noordwestelike dele van die land aangetref, sowel as in die streek vanaf Ventersdorp en Klerksdorp tot Pretoria, asook Kwazulu Natal, Oostelike Provinsie, Alexandria, Wes-Kaap, Clanwilliam, Robertson en Swellendam. Oor die algemeen is hulle volop in die hoër-reënvalgedeeltes, asook in streke met gunstige mikroklimaat.⁵ Sneeu en ryp blyk 'n beperkende rol te speel in die bevolkingsdigtheid van bosluise van

volgende voedingstadium.² Elke stadium word dus op 'n ander gasheer deurgebring, hetsy lede van dieselfde of verskillende spesies.³ Hierdie bosluise is dwarsdeur die jaar aktief, behalwe tydens besonder koue winters.

Bosluise kom slegs op werweldiere voor en is verwant aan spinnekoppe en myte. Daar word tussen twee tipes bosluise onderskei: harde en sagte bosluise. By harde bosluise is die monddede van die bokant sigbaar. Almal het 'n harde dorsale skild (scutum) wat die volle boonste oppervlak van die mannetjie en 'n klein gedeelte agter die kapitolium (kop) van die wyfie, nimf en larwe bedek. Die res van die liggaam is leeragtig en elasties, om voorsiening te maak vir die groot hoeveelhede bloed wat ingeneem word tydens elkeen van die lewenstadia.

Bosluise ondergaan 'n proses wat beskryf word as 'n onvolledige metamorfose. Harde bosluise het vier lewenstadia: Die larwe broei uit die eier, gevolg deur die nimfstadium wat oorgaan in die volwasse bosluis (*imago*). Die diagram in Figuur 2.2 stel die lewenstadia van 'n driegasheerbosluis voor. Tydens elke lewenstadium is dit noodsaaklik om 'n bloedmaaltyd te verkry ten einde te kan oorleef en groei.

Bosluislarwes het slegs drie paar pote. Hulle voed en morfeer tot die nimfstadium. Die nimfe voed en morfeer tot die volwasse stadium. In die twee latere stadia (nimf en volwassene) is daar vier paar pote, kenmerkend van die spinagtiges (Arachnida). Die diere staan as 'n nimf bekend totdat seksuele volwassenheid bereik word.⁹ Op die derde gasheer loop die volgesuigde mannetjies rond op soek na wyfies. Nadat paring plaasgevind het, gaan die mannetjie dood. Volwasse wyfies voed, paar, lê 'n enkele werpsel van duisende eiertjies in die grond, en gaan dan dood.

Tydens elke lewenstadium voed die bosluis slegs een maal. Die kutikulum (buitenste oppervlak van die bosluis) kan groei om vir groot volumes ingesuide bloed voorsiening te maak. 'n Volwasse wyfie kan groei tot 288-624 maal die massa van haar ongevoede liggaam.¹⁰ Figuur 2.3 is 'n groeikurwe wat die sigmoïdale toename in liggaamsmassa aandui totdat die bosluis die gasheer verlaat³.

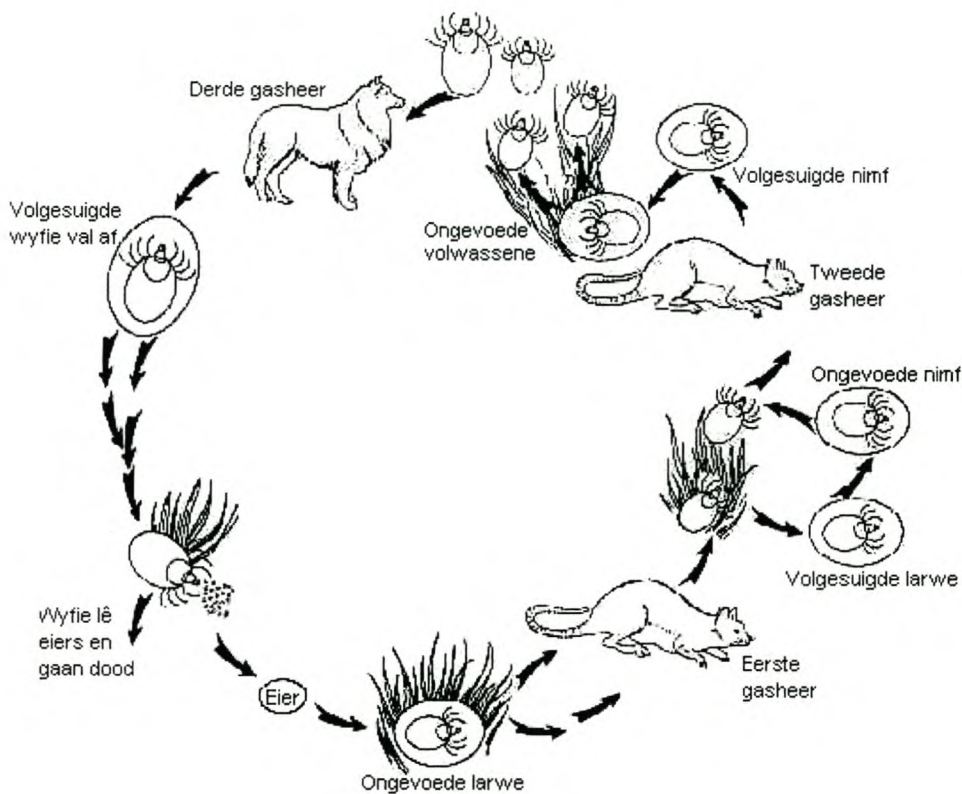


Fig. 2.2. Grafiese voorstelling van die lewensiklus van die driegasheerbosluus.

Vir die suksesvolle bevrugting van wyfies, is dit 'n voorvereiste dat volwasse mannetjies die bloed van hul gasheer moet suig en drink. Die mannetjies drink die gasheerbloed vir 'n tydperk van ongeveer 3-5 dae, waartydens hul liggaamsmassa met 100-200% kan vermeerder. Hulle bly op die gasheer waar hulle vir 'n paar weke tot selfs 2-3 maande rondbeweeg op soek na wyfies. Dit is egter moontlik dat klein bloedmaaltye gedurende hierdie tyd ingeneem word soos wat die bloed van die oorspronklike bloedmaal verteer word.

Volwasse wyfies bly vir sewe tot twaalf dae aan die gasheer vasgeheg, maar die meeste groei vind gedurende die laaste dag van voeding plaas. Dit gebeur selde dat die wyfie ten volle volgesuig is binne minder as 5 dae van voeding.³ Normaalweg, in die geval van *Haemaphysalis*, word 1800 tot 2400 eiers binne twee weke gelê indien 'n gunstige plek

gevind word². Dit neem die eiers omtrent 1 maand in die somer en 3 - 4 maande by laer temperature om uit te broei.⁵

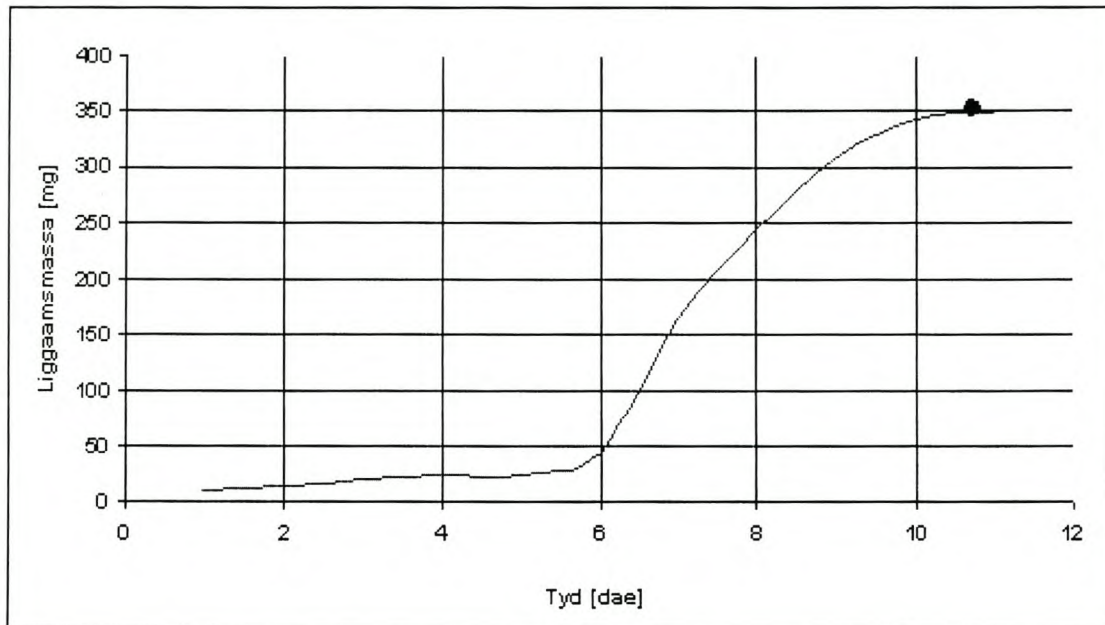


Fig. 2.3. Algemene groeikurve van die liggaamsmassa van volwasse wyfiebosluise tydens voeding. Die swart punt dui die tydstop aan wanneer die wyfie van die gasheer afval.

Paring vind nie plaas as die mannetjie *Haemaphysalis* nie 'n voldoende hoeveelheid bloed ingesuij het nie. Die mannetjie klim op die wyfie en beweeg tussen die tweede en derde ledemate van die wyfie deur om onder haar in te kom. Die wyfie help hierdie beweging deur haar agterlyf effens op te lig. Die mannetjie bring homself in lyn met die wyfie, met hul ventrale oppervlaktes na mekaar gedraai, en hou aan die wyfie se ledemate vas. Die mannetjie soek na die genitale opening van die wyfie deur van sy monddede gebruik te maak, waarna die bevrugtingsproses geskied.^{11, 12}

In gematigde temperatuurtoestande, soos in Suid-Afrika, is ongeveer een generasie per jaar aan die orde van die dag.⁸ Volwassenes is oor die algemeen meer volop tydens die gunstiger somermaande.

Gashere sluit meestal honde, maar ook ander huisdiere in, sowel as wilde diere soos groot katte, jakkalse en wildehonde. Nimfe en larwes word ook gereeld op klein knaagdiere, bv. rotte en muise gevind.⁵

2.4 Fisiese Kenmerke van *Haemaphysalis*

Haemaphysalis het vier paar pote, elk met ses segmente. Die voorste paar pote word ook gebruik as sintuigorgane. *Haller se orgaan* op die voorpote is klaarblyklik met die reuksintuig geassosieer asook met die waarneming van feromone²⁰. Daar is geen maklik uitkenbare sigbare patrone of merke op die liggaam te sien nie.

Die idiosoma (liggame) is verdeel in die prosoma (segmente wat monddele en pote bevat) en die opisthosoma (segmente agter die vierde paar pote).⁹ In Figuur 2.4 word die mees prominente kenmerke van die geelhondebosluis geïllustreer.

Die eienskappe van die nimfe is soortgelyk aan dié van die wyfie, maar is minder prominent. Die scutum (skildagtige plaat, posterior van die kopstuk) is pentagonaal, net so lank as wat dit breed is, met geronde rante. Die foveae dorsales word by wyfies net agter die scutum aangetref, en by mannetjies in die middel van die scutum. By hierdie porieë word vlugtige feromone vanaf die foveale kliere in die onderliggende weefsels afgeskei¹⁶.

Die larves het dieselfde kapitolium (kop) as the nimfe, met die scutum effens breër as wat dit lank is.¹³

Die monddele bestaan uit 'n rostrum ('n gepaarde ankerorgaan), met hake wat na agter buig, en 'n paar skerp mandibels (kake) wat longitudinaal in kanale op die rostrum beweeg. Hulle is duidelik van bo af sigbaar. Twee monddele wat aan die buitekant vasgeheg is, is die hoogs beweeglike palpe, waartussen die gepaarde chelicerae sigbaar

is. Die chelicerae beskerm die hipostoom, die staafvormige struktuur in die middel. Tydens voeding beweeg die palpe lateraal en dring nie die vel van die gasheer binne nie. Die hipostoom boor egter in die vel van die gasheer in tydens voeding.

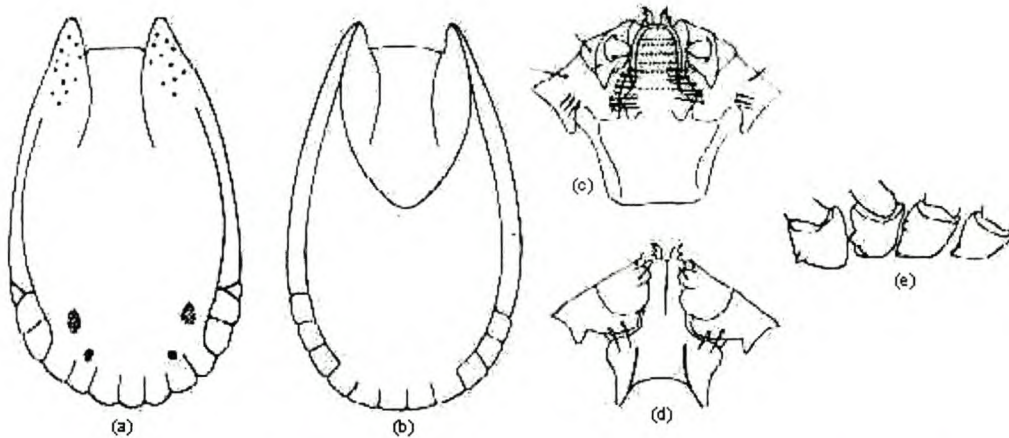
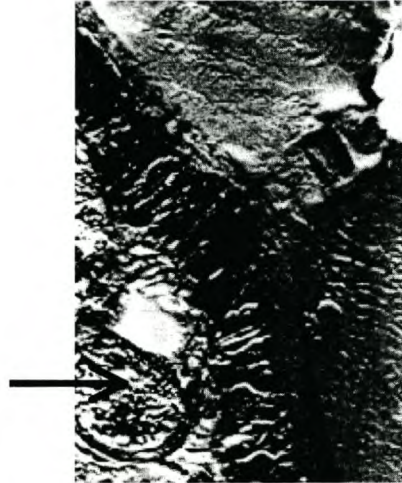


Fig 2.4. *Haemaphysalis leachi*. Die idiosoom (liggaam) van die mannetjie (a); die idiosoom en skutum (skildagtige plaat) van die wyfie (b); die onderaansig (ventraal) van die kapitolium (kopgedeelte) van die ongevoede wyfie (c); die bo-aansig (dorsaal) van die kapitolium van die wyfie (d); tarsi (aanhegtings van bene aan liggaam) en die coxae (bene) wat daaruit groei (e), dieselfde by mannetjie en wyfie.

Hul liggaamsbedekking bestaan uit 'n eksoskelet wat as 'n integument bekend staan. Hierin is die dermale kliere (Figuur 2.5) geleë. Twee tipes dermale kliere is bekend. Tipe I is meer talryk en ongeveer 80 – 100 μm in volgesuigde wyfies. Tipe II raak veel groter, tot 400 μm , in volgesuigde wyfies. Die kutikula is 'n wasagtige bedekking wat vog binne die liggaam hou en die liggaam teen skrape en klein beserings te beskerm. Dit word gevorm deurdat die dermale klierselle 'n dun lagie rondom die alveolêre holte vorm en olierige stowwe afskei wat oor die liggaam versprei en droog word wanneer dit met lug in aanraking kom. Daar is waargeneem dat daar soms klein druppeltjies op die liggaamsoppervlak sigbaar is, veral by die nimfe en wyfies. Deur blootstelling aan skerp lig, hitte of meganiese irritasie word die produksie van afscheidings deur hierdie kliere gestimuleer.¹⁸ Die Tipe II dermale kliere by *Amblyomma* spesies is verantwoordelik vir

die afskeiding van die feromoon wat die mannetjie stimuleer om op die wyfie te klim sodat paring kan geskied¹⁹.



Figuur 2.5. 'n Snit deur die integument in die omgewing van 'n dermale klier waar die groot dermale kliersel (→) onder die klierbuis sigbaar is.

2.4.1 Chemiese samestelling van die kutikula

Daar is nie veel inligting in verband met die chemiese samestelling van die kutikula van bosluise bekend nie, hoewel dit bekend is dat die hoofkomponente van alle Arthropoda (geleedpotiges) proteïene, chitien en lipiede is. Die struktuur van die dermale kliere is soortgelyk aan dié van die feromoonkliere. Vrye vetsure, afkomstig vanaf metielkarboksilate, asook triasielgliserole, cholesterol, cholesterielesters, cholestanol, cholestanieloleaat en ander vetsuuresters van cholesterol, verskeie sterole en sterolesters is al in die afskeidings van hierdie kliere geïdentifiseer. Klein hoeveelhede n-alkane (C_{22} – C_{35}) is ook gevind deur GC-analise van die kutikula van *Dermacentor variabilis*, maar geen alkene of aldehyede is aangetref nie. Cholesterieloleaat is geïdentifiseer as die seksferomoon in *D. variabilis* wat die mannetjie stimuleer om op die wyfie te klim.¹⁸

Daar is gevind dat die pienk vloeistof wat deur die dermale kliere van die Australiese verlamningsbosluis, *Ixodes holocyclus*, afgeskei word, 'n gifstof bevat wat verlamming veroorsaak, en ook in die afscheidings van die speekselkliere van hierdie bosluise voorkom.¹⁸

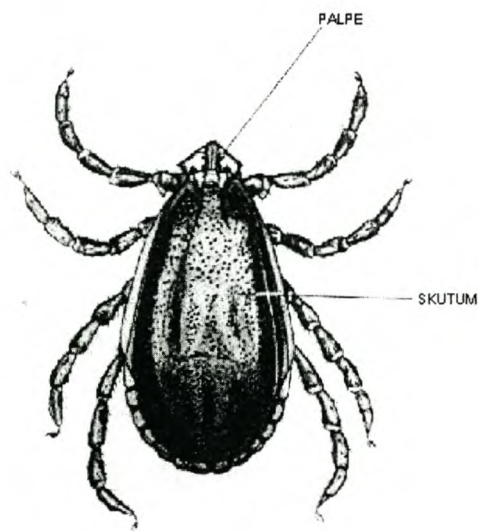
2.5 Onderskeid Tussen Mannetjies en Wyfies

Seksuele demorfisme is eers in die volwasse stadium sigbaar¹⁶. Die liggaam van die mannetjie is lank en smal, omtrent 2-3 mm in lengte. Die idiosoma (liggame) van die mannetjies is amper heeltemal deur die rigiede scutum bedek en kan nie besonder baie uitsit of rek nie. Ongevoede wyfies het rooibruin langwerpige liggame, omtrent soos dié van die mannetjies, maar effens groter. Die basis van die kapitolium is korter en breër as die mannetjie s'n. Hul scutum is effens verleng, ongeveer 25-33% langer as wat dit breed is, en vernou effens na agter.¹³ Die wyfie se scutum word gedefinieer as 'n anterodorsale (voor op die rugkant) skild of plaat. Volgesuigde wyfies is veel groter, omtrent 1 cm in lengte, en hoofsaaklik grys van kleur. Kyk Plaat 1. Hul pote, monddele en scuta is rooibruin van kleur. Figure 2.6 en 2.7 stel onderskeidelik die mannetjie en wyfie *Haemaphysalis leachi* voor.

2.6 Beheer van Bosluisgetalle

Ten spyte van die vanselfsprekende noodsaaklikheid om bosluisgetalle te beheer, is dit steeds 'n ontsaglike en duur taak. Die wye verspreiding van die meeste bosluise tussen plante, wat dit moeilik maak vir akarisides om hulle te bereik sonder om die natuurlike omgewing met groot hoeveelhede gifstowwe te besoedel, die feit dat hul nie gereedelik op die liggame van hul gashere rondbeweeg na aanhegting nie, wat dit noodsaaklik maak om die totale liggaamsoppervlakte van die gasheer te behandel, die lewenstyl van bosluise wat tussen gashere skuil in tonnells, gate en krake waar akarisides hul nie kan bereik nie, hul enorme voortplantingstempo, wat gereelde behandeling van diere en die omgewing

om herinfestering te voorkom, noodsaak, asook hul robuuste lewenstyl en taatheid, wat dit vir bosluise moontlik maak om vir maande of selfs jare ongesiens voort te leef nadat plaagbeheer toegepas is, is van die grootste struikelblokke vir die effektiewe beheer van hierdie parasiete¹⁵.

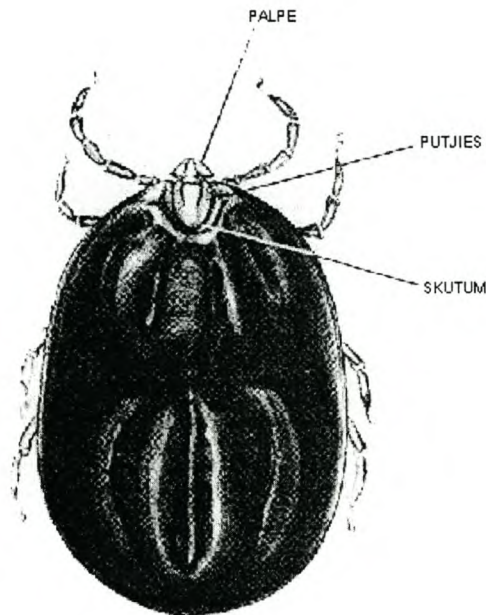


Figuur 2.6. Die geelhondebosluismannetjie, *Haemaphysalis leachi*, 'n lang, relatief smal, rooibruinkleurige bosluis. Palpe is kort, wyd en driehoekig. Baie ondeurlopende putjies is op die skutum teenwoordig.

Bosluisgetalle word meestal beheer deur 'n kombinasie van chemiese en nie-chemiese metodes, asook verwydering van die bosluise met die hand, bv. vanaf troeteldiere. Chemiese beheer is waarskynlik die algemeenste metode en sluit in behandeling met insekdodersproei, -poeiers en aandrupmiddels, asook die dip van diere met bosluis-spesifieke middels. Die poeiers word oor kleiner areas gebruik en bevat silikajel, wat 'n uitdrogingseffek op die bosluise het. Verskeie afweermiddels en gifstowwe word gebruik, waarvan die mees algemene gifstof N,N-dietiel-*m*-toluamied (DEET) is¹⁵.



PLAAT 1. *Haemaphysalis leachi* wyfie (links) en mannetjie (regs).



Figuur 2.7. Die geelhondebosluiswyfie, *Haemaphysalis leachi*. Die palpe is kort en driehoekig, maar effens meer verleng as dié van die mannetjie. Talryke putjies is redelik klein en onderbroke. Die skutum is verleng en vernou na agter.

Nie-chemiese beheermaatreëls kan rondom die huis as volg toegepas word:

Gras en onkruid moet so kort as wat prakties moontlik is gehou word. Dit bevorder die uitdroging van die bosluisliggame in droë, warm weersomstandighede, verhinder die opsporing van alternatiewe gashere, veral by veelvuldige-gasheerbosluisse, en verminder die hoeveelheid pesdoder wat vir die doeltreffende bestryding van die bosluisse aangewend moet word.

Voëlneste moet uit die omgewing verwyder word om die getalle van sagte bosluisse te verlaag.

Reste en afvalstowwe, asook nesmateriale wat deur knaagdiere agtergelaat is, moet verwyder word.

Openinge waar eekhorinkies, ratels, vlermuise en ander knaagdiere kan in- en uitbeweeg, moet afgeskerm of verseël word.

Skeure en krake waarin bosluisse kan skuil, moet herstel en dig gemaak word.

Ander omgewingsbehandelings sluit onkruidodders, beheerde brande, meganiese verwydering van plante, die verwydering van blare en takke op die grond, asook verwydering van hoë bome of ander plante wat skaduwee verskaf en intensiewe blootstelling aan sonlig sou kon verminder. Hierdie handelings, hoewel nie noodwendig omgewingsgunstig, veroorsaak dat die bosluise nie genoegsame skuiling het teen intense hitte of koue nie. Hierdie metodes kan ook getalle van ander gashere van die bosluise verminder, wat die waarskynlikheid van oordraging van siektes kan verminder. Dit is nie bekend of hierdie omgewingsbehandelings die vermindering van bosluisgetalle direk of indirek (byvoorbeeld deur uithongering) tot gevolg het nie¹⁵.

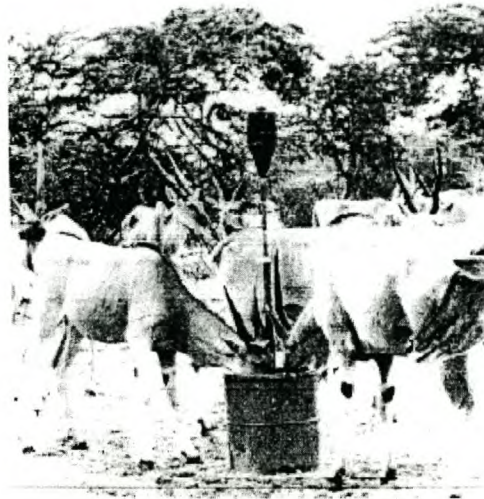
Vir die beheer van bosluise op landboukundige vlak, word diere hoofsaaklik gedip met pesdoders, of meer spesifiek, akarisides. Dit is chemiese middels wat bosluise doodmaak of aanhegting verhoed. Bespuitings, dipbehandelings, direkte aanwending, kleinarea-aanwending en inspuitbare medisyne is beskikbaar vir hierdie doel.

Nog 'n strategie wat deur boere aangewend word, is die toepassing van wisselweiding. Behalwe vir die feit dat dit voordele vir beide die grond en plantegroei inhou, sal bosluise, wanneer daar vir 'n geruime tyd geen gashere in 'n sekere area beskikbaar is nie, genoop word om uit daardie area te beweeg, wat die area dus bosluisvry maak wanneer die diere weer daarheen terugkeer.

Biologiese beheer word ook toegepas, soos byvoorbeeld met die loslating van *Hunterellus hookeri*, 'n wespspesie wat parasiteer op sekere bosluisspesies, byvoorbeeld *Dermacentor variabilis*, in die ooste van Massachusetts, VSA. Vuurmiere, *Solenopsis invicta*, is 'n voorbeeld van predatore op bosluise, waar die eiertjies, larwes asook volgesuigde wyfies van die spesie *Amblyomma americanum* aangeval, doodgemaak en geëet word. Hierdie miere val ook ander diere, soogdiere en selfs mense aan, wat die moontlikheid om hierdie miere as biologiese plaagbeheer toe te pas, uiters onprakties maak. Roofdiere, soos die bosluisvoël, *Bubulcus ibis*, dra ook by om bosluisbevolkings op 'n natuurlike biologiese wyse onder beheer te hou.

Bosluislarwes kan ook deur sekere plante doodgemaak word. Molassegras, *Melinis minutiflora*, en tropiese peulplante, *Stylosanthes hamata* en *S. scabra*, verstrik larwes van die suidelike veebosluis, *Boophilus microplus*, en kan hulle selfs doodmaak. Hierdie plante is bedek met 'n dik vloeistof wat deur haarkliere afgeskei word, wat die bosluislarwes immobiliseer. Die afskeidings is nie afwerend vir die bosluise nie, maar daar word geen bosluise in areas waar hierdie plante natuurlik voorkom, gevind nie. Die larwes word vergiftig deur ongeïdentifiseerde dampe wat vanaf hierdie plantmateriaal afkomstig is. Hierdie beheermetode van bosluisgetalle kan effektief aangewend word in tropiese en subtropiese gebiede. Omdat die plantafskieding egter 'n afwerende effek op bosluise soos *Boophilus decoloratus*, *Rhipicephalus appendiculatus* en *Amblyomma hebraeum* wat in Zimbabwe en ander streke van Suider-Afrika voorkom, sal hulle nooit naby genoeg daaraan kom om deur die dampe vergiftig te word nie, en die bosluislarwegetalle van hierdie spesies sou dus nie hierdeur beheer kon word nie.

Eksperimente is ook gedoen in verband met die vrystelling van akarisides deur gasheerdiere op hulself. PVC buise wat uitgevoer is met akariside-bevattende olie is in areas waar die Amerikaanse hondebosluis, *Dermacentor variabilis*, volop voorkom, geplaas met grondboontjebotter as aas vir muise en rotte, wat die primêre gashere vir hierdie bosluise is. Soos die diere dus deur die buise beweeg om by die aas uit te kom, behandel hul hulself met die akariside. 'n Ander metode is om watte wat deurdrenk is met akariside in bio-afbreekbare kartonbuise in die habitat van primêre gashere te plaas. Muise gebruik die watte om hul neste uit te voer, en sodoende hulself en die ander muise in die nes te behandel teen bosluise. Hierdie metode was egter nie suksesvol met alle muisspesies nie. Daar is ook met die selfbehandeling van vee en wild in Zimbabwe geëksperimenteer. Die apparaat verskaf 'n oliegerige vloeistof uit 'n reservoir wanneer die diere hul koppe daarby insteek om by die voer in die bak daaronder uit te kom. Die gifstowwe versprei soos gewone aandrupmiddels oor die liggame van die diere. In Figuur 2.8 word só 'n apparaat voorgestel.



Figuur 2.8. 'n Voorbeeld van die apparaat waarmee elande, *Tauratragus oryx*, hulself met akaricides behandel.

Hierdie is voorbeelde van die behandeling van gashere. Produkte waarmee die bosluise direk behandel kan word, is nog nie kommersieel beskikbaar nie, maar kan die volgende insluit: Die aanwending van koolstofdiksied wat as lokstof vir die bosluise dien gekombineerd met akaricides, of die gebruik van feromone as lokstof wat met giftowwe gekombineer word.

Navorsing oor die gebruik van feromone as lokmiddels en verwarringsmiddels word egter wel gedoen. In Suid-Afrika is feromoonekstrakte van volgesuigde *Amblymma hebraeum* mannetjies tesame met die gifstof toksafeen met belowende resultate op vee aangebring, veral omdat die bosluise self na die gifstof aangetrek word in plaas daarvan om groot areas met groot hoeveelhede akaricides te behandel. Klein druppelvorminge voorwerpe is met seksferomone en akaricides behandel en op 'n gasheer geplaas. Mannetjies het hierdie voorwerpe vir wyfies aangesien en is vergiftig sodra hulle met die voorwerpe probeer paar het. Die resultaat was 'n 100% paringsontwrigting van die bosluise op daardie gasheer. Daar is egter nog geen kommersieel-vervaardigde produkte wat van feromone gebruik maak om op vee, troeteldiere of plantegroei te gebruik nie.

Daar is gevind dat Zebu-beeste, *Bos indicus*, 'n veel groter weerstand teen bosluise het as Europese beeste, *Bos taurus*. Daar bestaan dus ook 'n moontlikheid om deur genetiese manipulasie diere se ingebore weerstand teen bosluise te verhoog. Die inenting van diere met antigene wat van bosluise afkomstig is, om bosluise wat die bloed van die behandelde gasheer gesuig het te laat vrek, is ook al bestudeer.

'n Bevolking van die grotbosluis, *Ornithodoros tholozani*, is deur gamma-bestraling met 'n ⁶⁰Co-bron (16 Krad vir mannetjies, 4 Krad vir wyfies) gesteriliseer. Daar is gevind dat die bestraling ook 'n inhiberende effek op die vertering van bloed gehad het, wat veroorsaak het dat, behalwe dat hulle nie kon voortplant nie, die bosluise na vrylating ook nie honger geraak het nie. Verbastering is ook 'n manier van sterilisering, wat suksesvol met veebosluise uitgevoer is deur *Boophilus annulatus* en *B. microplus* in heterospesifieke pare te isoleer. Chemiese steriliseermiddels is al vir die beheer van bosluisgetalle oorweeg en die vergassing van die eiers van *Dermacentor variabilis* het gelei tot gedeeltelike steriliteit in volwasse wyfies¹⁵.

Vir die beskerming van mense teen bosluise kan voorsorgmaatreëls getref word deur:

- stewels of skoene wat geseël kan word te dra,
- broekspype binne-in skoene of stewels te druk, sokkies oor die broekspype te trek en die blootgestelde sokkies met kleefpleister te seël,
- afweermiddels en/of akaricides aan klere en blootgestelde areas op die liggaam aan te wend en
- deeglike inspeksie van die persoon en dekontaminering van klere nadat die geïnfesteerde habitat verlaat is.¹⁵

2.7 Bosluise op Honde

Honde kan bosluise optel terwyl hulle deur woongebiede met houtstrukture of areas met ruie plantegroei beweeg, selfs as hulle net vir 'n wandeling in 'n park geneem word. 'n Bosluishalsband, wat die akaricide stadig op die hond se liggaam vrystel, kan as voorsorg

gedra word, maar is blykbaar nie in alle gevalle effektief nie. Direkte aanwending op die vel, waar die hele liggaam van die hond met akaraside-bevattende sjampoe, poeier of aerosolsproei bedek word, asook medikasie in die vorm van tablette of inspuittings, waar die akarisides deur die liggaam in die bloedsisteem sirkuleer, word meer algemeen gebruik. Bosluise bly in dieselfde posisie op die gasheer tydens die voedingstydperk, behalwe vir die periode direk nadat kontak met die gasheer gemaak is, voordat voeding begin, en die tyd wanneer mannetjies op die gasheer rondloop op soek na wyfies. Dit veroorsaak dus dat groot hoeveelhede akarisides vermors word, omdat die hele liggaamsoppervlak van die hond met akarisides bedek moet word om al die stasionêre bosluise, soms uiters onopsigtelik, uiteindelik te bereik¹⁵.

Om die voorkoms van bosluise op honde te verminder, word gereelde inspeksie en versorging van die honde aanbeveel, asook die gereelde skoonmaak van die troeteldier se slaaparea en beddegoed. Besmette troeteldierbeddegoed moet versigtig gewas of vernietig word. Die slaaparea kan ook met poeiers of sproei behandel word. Daar is middels beskikbaar wat veilig, ekonomies, nie-onwelriekend, tekstielvriendelik en effektief teen alle huishoudelike peste is.

Buite die huis kan bosluisgetalle ook beheer word deur aandag te skenk aan die toestande van grasperke, bosse en struik, asook inkruipplekke van enige grootte onder geboue. Chemiese plaagdoders kan ook hier aangewend word.

Binnenshuis kan vloerlyste, meubels en vloere, asook skeure en krake, rante van matte, die onderkant van voetmatjies en deure met plaagdoders behandel word.¹⁴

Verwysings: Hoofstuk 2

1. C.J Howell, J.B. Walker en E.M. Nevill, "Bosluise, myte en insekte van huisdiere in Suid-Afrika", Dept. Entomologie, Navorsingsinstituut vir Veeartsenykunde, Onderstepoort, pp. 4-5 (1978).
2. D.R. Arthur, "Ticks and Disease, International Monographs on Pure and Applied Biology", Pergamon Press, London, pp.204-211 (1962).
3. Verw. 2, pp.132-144.
4. J. van Heerden, *Journal of the South African Veterinary Association* **66**:18-27 (1995).
5. Verw. 1, pp. 28-31.
6. Verw. 2, pp. 242-249.
7. South African Plant Protection Research Institute, "Common Names of Insects", p. 65 (1963).
8. G. Theiler, "Factors Influencing the Existence and the Distribution of Ticks, The Biology and Control of Ticks in Southern Africa, Proceedings of a Symposium", Rhodes Universiteit, Grahamstad, pp. 17-36 (1969).
9. T.H. Savory, "The Arachnida", Edward Arnold & Co., London, pp. 140-153 (1935).
10. D.E. Sonenshine, "Biology of Ticks Volume 1", Oxford University Press, p. 181 (1991).
11. G.H.F. Nuttall en G. Merriman, *Parasitology* **4**:39 (1911): Verwysing in D.R. Arthur, "Ticks and Disease, International Monographs on Pure and Applied Biology", Pergamon Press, London, p. 180 (1962).
12. K. Samson, *S. B. Ges. Natwrf. Fr. Berlin*, **8**:486 (1909): Verwysing in D.R. Arthur, "Ticks and Disease, International Monographs on Pure and Applied Biology", Pergamon Press, London, p. 180 (1962).
13. Verw. 2, pp. 47-79.
14. Professional Pest Control Products, 6920 Pine Forest Road, Pensacola, Florida, 32526, U.S.A.

15. D.E. Sonenshine, "Biology of Ticks Volume 2", Oxford University Press, pp. 333 – 371 (1991).
16. Verw. 10, p. 18.
17. Verw. 10, p. 45.
18. Verw. 10, pp. 89 - 97.
19. Verw. 10, p. 357.
20. Verw. 10, p. 364.

Hoofstuk 3

Eksperimenteel

3.1 Algemeen

Dichlorometaan (Merck, SupraSolv Grade) is gebruik vir alle ekstraksies. Spuitnaalde is met dichlorometaan (Riedel de Haën, Pesticide Analysis Grade) gewas en gespoel deur die dichlorometaan onder vakuum daardeur te suig, en die naalde en suierstafies deeglik met die oplosmiddel af te spoel.

Alle Pyrex glasware is gewas met seep en water, gespoel met gedistilleerde water, aseton en dichlorometaan, en gedroog in 'n muffeloond by 400°C om enige spore van geadsorbeerde organiese materiaal te verwyder.

3.2 Versameling en Ekstraksie van Materiaal

Die *H. leachi* bosluise is lewendig versamel deur personeel van die Dierebeskermingsvereniging (DBV) van Stellenbosch, Somerset Wes, Gordonsbaai, Paarl, Darling en Wellington, asook diereklinieke en –hospitale in Stellenbosch, Strand en Somerset-Wes. Vir hul tyd en moeite is hul teen R2,00 per groot wyfiebosluis vergoed. Om te verseker dat hul lewend bly totdat hul afskeidings opgevang kon word, is elke bosluis met die hand verwyder voordat die honde gedip is. Alhoewel die bosluise meer volop in die somermaande is, kan warm winterweer ook die eiertjies aandryf om uit te broei en te ontwikkel, wat 'n konstante, hoewel onvoldoende, voorraad bosluise verseker het.

Slegs volgesuigde wyfies is versamel wat, as gevolg van hul groter liggame, die hanteringstaak vergemaklik het. Hulle is in 1-liter joghurtbakkies of ander plastiekbakkies, soos byvoorbeeld botterbakkies gehou, wat deeglik skoongemaak is en waarin luggaatjies met 'n aansteekspeld aangebring is. Die bakkies is deeglik

toegemaak met hul plastiekdeksels om ontsnapping van die bosluise te voorkom en is met papierhanddoeke uitgevoer om redelik sindelike toestande tydens gevangenskap te verseker en om ook 'n groter loopoppervlak vir die bosluise te verskaf om die kansse dat hulle mekaar kon bevuil tot 'n minimum te beperk.

Bosluise is oor die algemeen redelik robuuste diertjies, ook as gevolg van hul lewenstyl. Hulle kan vir dae sonder voeding leef, en val tussen maaltye van hul gashere af. Dit beteken dat dit relatief maklik was om die volgesuigde lewende bosluise van die honde af te haal.

Tydens die monsterversameling is die bosluise met 'n pinset hanteer ten einde:

die bosluise maklik maar stewig vas te hou,
'n groter area van die liggaam bloot te stel vir irritasie,
kontaminering van die monsterekstrak met verbindings op 'n mens se hand te vermy terwyl die kutikulêre afskeidings met dichlorometaan van die bosluise afgespoel is,
die gesondheidskadefike kontak van die persoon wat die afskeiding versamel met dichlorometaan te vermy.

3.3 Instrumentasie

3.3.1 GC en GC-MS

'n Carlo Erba 4200 Gaschromatograaf, met 'n vlamionisasiedetektor (FID) en 'n "split/splitless" inlaat, is gebruik vir konvensionele GC analyses. Die FID is gehou by 'n temperatuur van 280°C. GC kolomme (40 m x 0.3 mm) is belaa met die stasionêre fase PS089 teen 'n laagdikte van 0.25 µm. Die draergas (H₂) se liniêre vloeisnelheid is gestel op 50 cm/sekonde. Die ekstrakmonsters is ingespuut by 'n inlaatteratuur van 220°C, termies gefokusseer op die kolom by 'n temperatuur van 30°C en geanaliseer deur van 'n temperatuurprogram, vanaf 40°C tot 250°C teen 2.0°C per minuut, gebruik te maak. Temperatuurprogramme met verhittingstempo's van óf

2.0°C/min óf 4.0°C/min is gebruik vir GC-analises van gesintetiseerde verbindings, asook vir retensietydvergelykings.

Lae-resolusie elektronimpak-massaspektrometrie (LR EI-MS) is uitgevoer op 'n Carlo Erba QMD 1000 Gaschromatograaf-Massaspektrometer (GC-MS), deur van die volgende parameters gebruik te maak: Die massaspektra is opgeneem by 70 eV, die inlaattemperatuur was 220°C, die tussenvlaktemperatuur 250°C en die ionbrontemperatuur 180°C. Temperatuurprogramme, soos hierbo beskryf, is gevolg.

Die druk in die ionbronkamer was ongeveer 2×10^{-5} mbar by 'n kolomtemperatuur van 40°C, en het afgeneem tot ca. 1×10^{-5} mbar teen die einde van die temperatuurprogram, met die kolomtemperatuur by 250°C. 'n Aftastempo van 0,9 s/spektrum met 'n 0,1 s interval tussen spektra is gehandhaaf. Die liniêre vloeisnelheid van die draergas, helium, was 31.7 cm/s.

3.3.1.1 Monsterinlaat met Inlaatstroomverdeling

Tensy daar anders gespesifiseer word, is die volgende parameters gehandhaaf: 'n Draergasverdeling met 'n vloeï van 1,7 ml/min deur die kolom, 10 ml/min deur die uitlaatklep en 'n septumspoelgasvloeï van 1 ml/min is ingestel. Monsters van 1,0 µl is per hand ingespuut. Die monsterinlaattemperatuur was 220°C en die vlamionisasiedetektortemperatuur 280°C. Die inlaat- en detektormodules is nooit afgeskakel nie en is altyd by hierdie temperature gehou.

3.3.1.2 Monsterinlaat sonder Inlaatstroomverdeling

Om hierdie tipe monsterinlaat te gebruik is die naaldklep wat die verdelingsvloeï reël toegedraai vir 'n periode van 150 sekondes, tensy anders gespesifiseer, waarna dit weer oopgedraai is met die verdelingsvloeï en ander parameters soos vir inlaat met stroomverdeling hierbo. Om die massaspektrometriese data meer betroubaar te maak, is 2,5 µl van die boslusekstrakte per analise ingespuut.

3.4 Monsternemingsmetodes

3.4.1 Oplosmiddelekstraksie van Afskeiding

Die ru-ekstrak wat voorberei is soos uiteengesit in Afdeling 3.6.1, is in Reacti Vials in hoeveelhede van ongeveer 2 ml tot $\pm 10 \mu\text{l}$ ingedamp by kamertemperatuur (22°C) deur die doppie van die Reacti Vial effens los te skroef sodat die verdamping geleidelik oor 'n tydperk van 24 - 36 uur kon plaasvind ten einde die monsters genoegsaam vir GC en GC/MS analyses te konsentreer. 'n Volume van $2.5 \mu\text{l}$ van die gekonsentreerde bosluisekstrak is per analise ingespuut.

3.4.2 Monsterverryking met Behulp van SPME

Vir bodamp analyses is SPME (*soliede-fase mikroëkstraksie*) gebruik om vlugtige verbindings te ekstraheer uit die bodamp van 'n 25 ml glas (Pyrex) botteltjie met 10 volgesuigde wyfies. Die Teflon-belaagde septum is uit die doppie van die botteltjie verwyder en 'n gaatjie van 5 mm in deursnee is deur die doppie geboor, terwyl die septum heel gehou is. Vervolgens is 'n gaatjie met 'n passerpunt deur die septum gesteek, gesentreer in die middel van die gaatjie deur die doppie. Die naald van die SPME-houer is deur die gaatjie gesteek en die $100 \mu\text{m}$ polidimetielsiloksaan SPME vesel is vir 5 uur by kamertemperatuur (22°C) blootgestel aan die lewende bosluise. Die gesorbeerde vlugtige verbindings is van die vesel by 'n inlaatemperatuur van 220°C vir 150 sekondes gedesorbeer vir GC-MS analise met behulp van dieselfde kolomme en gaschromatografiese parameters, soos hierbo beskryf. Die bodamp van geïrriteerde en nie-geïrriteerde wyfies is op hierdie manier met mekaar vergelyk.

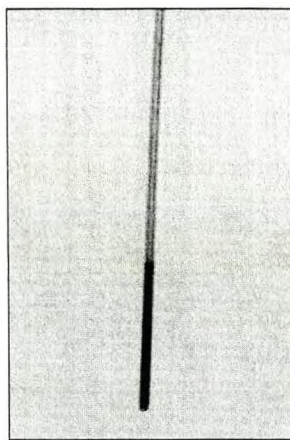
3.4.3 Monsterverryking deur Adsorpsie op Geaktiveerde Koolstof

Adsorpsie op aktiewe koolstof is as alternatiewe monsterverrykinsmetode ondersoek. Geaktiveerde koolstofgranules, verskaf deur The British American Tobacco Company, soos dit as sigaretfiltermateriaal in Ransom Select sigarette gebruik word, is fyngemaal en deur twee siwwe gesif; eers deur $45 \mu\text{m}$ maasgrootte en daarna $38 \mu\text{m}$

maasgrootte. Die fraksie op die 38 μm sif (partikelgrootte 38-48 μm) is vir verdere werk gebruik. Dit is belangrik om daarop te let dat die koolstof nat gesif is om die opbou van statiese elektrisiteit wat die sifproses bemoeilik, te vermy. Die versamelde koolstof is met water gewas en vir 2 uur in 'n oond by 100°C gedroog.

'n Lengte van 15 mm van die buitewand van 'n silikabuis (10 cm x 0,5 mm) is met geaktiveerde koolstof belaag deur die koolstof met behulp van poliimied op die silikaoppervlak te fikseer (Figuur 3.1). Die kapillêr is vir twee uur by 100°C gedroog en daarna teen 2°C/min tot by 290°C verhit, oornag by daardie temperatuur gehou en afgekoel tot kamertemperatuur (22°C).

Na die val vir die verryking van 'n monster aangewend is, is die koolstofbelaagde stafie (KBS) vir hergebruik met dichlorometaan afgespoel en by 290°C verhit vir 60 minute.



Figuur 3.1. Die koolstofbelaagde stafie (KBS)

3.4.4 Kriopresipitasie van Vlugtige Komponente

3.4.4.1 Afkoeling met Droë Ys

'n Eksperiment wat as 'n tipe dinamiese bodamp-analise beskryf kan word, is met geïrriteerde *Haemaphysalis* bosluise gedoen. Die eksperiment het die

oordrag van die vlugtige organiese verbindings van die afskeidings van die bosluise na 'n kapillêre glasbuisie, waar dit kriogenies met behulp van droë ys vir analise met GC-MS vasgevang is op die binnewand van die buisie. Die volgende opstelling is gebruik:

Tien geïrriteerde bosluise is in 'n 25 ml Pyrex botteltjie geplaas. 'n Gaatjie van ongeveer 5 mm in deursnee is deur die bottel se doppie geboor, en twee gaatjies is regoor hierdie gaatjie in die septum gemaak, een vir 'n kapillêre glasbuisie, en die ander vir 'n kapillêre Teflon-buisie. Die glasbuisie is afgekoel met droë ys om die vlugtige organiese verbindings in die buisie uit te vries. Suiwer stikstof is met behulp van die Teflon-buisie in die flessie waarop die proppe gasdig vasgeskroef is, gestuur. Die oordrag van die vlugtige verbindings na die glasbuisie is toegelaat om vir een uur voort te gaan waarna die glasbuisie met twee porsies van 6 µl dichlorometaan uitgespoel is. Die resulterende oplossing van die vlugtige komponente is in 'n klein Reacti-Vial opgevang en tot ongeveer 4 µl ingedamp. Van hierdie konsentraat is 1 µl vir GC-MS analise gebruik.

3.4.4.2 Afkoeling met Vloeibare Stikstof

'n Soortgelyke eksperiment is uitgevoer, met die verskil dat vloeibare stikstof in plaas van droë ys, en helium in plaas van stikstof gebruik is om die vlugtige komponente uit die flessie oor te dra. Nadat materiaal vir 'n uur versamel is, is die buisie met dichlorometaan uitgespoel en die ekstrak in 'n klein Reacti-Vial opgevang. Twee vloeistoflae het gevorm, wat gedui het op die teenwoordigheid van water. Die ekstrak is oornag in 'n vrieskas gestoor. Twee fases was duidelik sigbaar: die dichlorometaanlaag onder met 'n yslagie bo-op. Die botteltjie is gesentrifugeer om te verseker dat die lae ten volle geskei het, en die waterlaag is versigtig met 'n Pasteurpipet verwyder. Die dichlorometaanekstrak is vir GC-MS-analise gebruik.

3.4.5 Monsterverryking deur Sorpsie in 'n Fase-Belaagde Oopbuisval

Die moontlikheid is ondersoek om die vlugtige komponente in 'n fase-belaagde oopbuisval te verryk. 'n Opstelling soos in die vorige eksperiment is gebruik met die verskil dat 'n kapillêre glasbuis van 90 mm, belaag met 10 μm van die stasionêre fase PS-255 (SE-30 ekwivalent), in plaas van 'n onbelaagde, afgekoelde buisie gebruik is, en verder dat ses bosluise in plaas van 10 gebruik is en die vlugtige komponente net vir 15 minute opgevang is. Die vlugtige komponente is in die GC se inlaat by 220°C gedesorbeer volgens die metode van Burger et al.¹ Onbevredigende resultate is verkry. Die ekstraksieproses is in 'n herhaling van hierdie prosedure toegelaat om vir 30 minute te verloop, maar die resultate was steeds onbevredigend aangesien onvoldoende verryking van die vlugtige organiese komponente van die afscheidings verkry is.

3.4.6 Oplosmiddellose Monsterneming

Monsters vir GC-MS analise met oplosmiddellose monstertoediening is soos volg voorberei: Glas mikrovesel-filtreerpapier (Whatman, Cat. no.1820 090) is in repies gesny, dun genoeg om in die glasbinnebuis van die inlaat van die gaschromatograaf te pas. Om kontaminasie te vermy, is die filtreerpapier konsekwent slegs met 'n skoon knyptangetjie hanteer en vooraf skoongemaak deur dit in 'n glasbinnebuis in die inlaatkamer van 'n gaschromatograaf vir twee uur by 220°C te verhit. Die binnebuis is met behulp van 'n strook papier gehanteer. Nadat die mikroglasveselpapierrepie met die binnebuis uit die inlaat van die gaschromatograaf gehaal is en toegelaat is om af te koel, is die repie gedeeltelik uit die binnebuis getrek en die bosluise is met die gedeelte van die papier wat uit die glasbuis gestek het, geïrriteer. Die afskeiding is geabsorbeer deur die geïrriteerde bosluise af te vee met die blootgestelde deel van die glasveselrepie, waarna die papierreep heeltemal in die binnebuis ingevou is, en die materiaal in die inlaat van die GC-MS sonder inlaatstroomverdeling vir 150 sekondes gedesorbeer is. Twee bosluise is per eksperiment gebruik.

3.5 Isolering van Aktiewe Materiaal

3.5.1 Preparatiewe Kapillêre Gaschromatografie

‘n Aluminiumblok wat elektries verhit kan word, is in die poort van ‘n Carlo Erba HRGC gaschromatograaf wat vir GC-MS koppeling voorsiening maak, aangebring. ‘n Gaatjie met ‘n deursnit van ca. 0.5 mm is in die aluminiumblok gemaak om voorsiening te maak vir die verhitting van ‘n silikabuis (binnedeursnit 0.3 mm) waarmee ‘n gedeelte van die draergas uit die kapillêre kolom in die oond van die gaschromatograaf na die buitekant van die instrument en die versamelingsopstelling gelei is. ‘n Kapillêre kolom (No. P142, 40 m x 0.3 mm) belaag met die stasionêre fase PS-255 (polidimetielsiloksaan) is met die Grob-inlaat van die chromatograaf verbind en die uitlaat van die kolom is aan een van die bene van ‘n 4-rigting stroomverdeler gekoppel. Die tweede been van die verdeler is met behulp van ‘n silikabuis (binnedeursnit 0.3 mm) aan die in-kolom-monsterinlaatsisteem van die GC gekoppel om ‘n vloeï van spoelgas deur die stroomverdeler te voorsien, die derde aan die detektor en die vierde silikabuis is deur die verhitte aluminiumblok gevoer vir die versameling van fraksies. Die draergasdruk (H_2) in die Grob-inlaat is by 1.1 kg/cm^2 ingestel en die spoelgasdruk is op 0.1 kg/cm^2 ingestel. Silikabuisse van ongeveer gelyke lengtes is vir die koppeling van die verdeler met die detektor en vir die opvang van fraksies geïnstalleer. Deur ‘n geskikte lengte silikabuis (0.1 mm binnedeursnit) waarvan die poliïmiedlaag weggebrand is, in die silikabuis na die detektor in te voer, is die verhouding van die vloeï na die detektor tot die opvangfasiliteit verminder na 1 : 4 ml/min (3 : 12 ml met spoelgas aangeskakel).

Oorspronklik is fraksies opgevang deur glasbuisies (lengte ongeveer 100 mm) met oop ente en ‘n interne deursnit net effens wyer as die silikabuis (ca. 0.4 mm), oor die glasbuisies te plaas, en die buisies met behulp van droë ys af te koel ten einde die eluerende materiaal in die buisies uit die draergas te presipiteer. Elke paar minute is ‘n vars glasbuisie in posisie geplaas om fraksies op te vang. Die versamelde materiaal is individueel met $10 \mu\text{l}$ dichlorometaan uitgespoel in klein koniese monsterflessies met skroefproppe voorsien van Teflon-belaagde septa.

Aangesien hierdie glasbuisies nie gasdig aan die silikabuis aangesluit het nie en om die gevolglike verlies van monstermateriaal as gevolg van aerosolvorming uit te skakel, is die metode soos volg gewysig om die draergas uit die kolom van analiete te stroop deur dit deur 'n oplosmiddel te borrel. Een punt van 'n aantal glasbuisies (95 mm x 0.35 mm binnedeursnit) is met die koniese punt van 'n grafiet/polimeer-stafie (potloodpunt, 3H) geruim sodat dit dig oor die uitlaatpunt van die silikabuis wat vir die opvang van die fraksies gebruik is, kon pas. Die beskermende poliïmiedlaag om die silikabuis het 'n goeie gasdigte koppeling van hierdie kapillêre glasbuis en die silikabuis verseker. Die kapillêre glasbuisies is elkeen met behulp van 'n klein vlammetjie in 'n L-vorm gebuig. Vir opvangdoeleindes is klein volumes (ca. 50 – 150 µl) van 'n geskikte oplosmiddel in 2 ml koniese flessies geplaas en die draergas is met behulp van die L-vormige buisies deur die oplosmiddel geborrel om daardeur te verseker dat die materiaal wat as gevolg van aerosol-vorming verlore sou kon gaan, in die oplosmiddel sou oplos. Die koniese flessies is dig toegeskroef met skroefproppe voorsien van Teflon-belaagde septa.

3.6 Biologiese Evaluering

3.6.1 Voorbereiding van Ekstrakte vir Toetse op Honde

Elk van die *Haemaphysalis* bosluise is ferm vasgehou met 'n skoon pinset, en geïrriteer met 'n klein kwassie totdat klein druppeltjies, die afskeidings van die dermale kliere, oral oor die liggaam sigbaar was. Die bosluis is met dichlorometaan met behulp van 'n Pasteurpipet afgespoel. Daar is van 'n pinset gebruik gemaak om hulle vas te hou terwyl hul met dichlorometaan gespoel is om maksimale kontakarea tussen die oplosmiddel en die leeragtige eksoskelet van die bosluis te verseker. Aanvanklik is ongeveer 1 - 2 ml suiwer dichlorometaan gebruik om elke bosluis af te spoel en die ekstrakte is in 'n 50 ml Pyrex botteltjie gekombineer. Nadat ongeveer 30 ml ekstrak versamel is, is elke bosluis daarna met 1 - 2 ml van die ekstrak afgespoel. Slegs wyfies is gebruik vir die versameling van monsters. Dit is maklik om volgesuigde *Haemaphysalis leachi* wyfies uit te ken omdat hulle groter en grys van kleur is in teenstelling met die rooibruin kleur van die mannetjies. Die ekstrak is

gestoor in 'n Pyrex glasbottel (50 ml) wat voorsien is van 'n skroefprop met 'n Teflon-belaagde digting. Die Pyrex bottel met die monster is in 'n yskas by 0°C binne-in 'n skoongemaakte glasfles gestoor om kontaminasie vanaf ander organiese vlugtige dampe in die yskas te vermy. Ten minste 100 bosluise was nodig om ongeveer 25 - 30 ml monsterekstrak te verkry wat die voldoende hoeveelheid bosluismateriaal bevat het. Die rede hiervoor word in Hoofstuk 4 bespreek.

Om die afweerwerking van die ekstrak te toets, is ca. 0,5 ml van die ongekonsentreerde ekstrak op 'n filtreerpapier aangebring. Die oplosmiddel, dichlorometaan, is toegelaat om te verdamp en die minder vlugtige organiese materiaal is op die filtreerpapier agtergelaat. Daar is met sorg gewerk om kontak met die hand te vermy, om sodoende kontaminasie met menslike reuke en dus misleidende resultate te vermy. Die filtreerpapier is daarom ook met 'n pinset gehanteer. 'n Kontroletoeis is voorberei deur 1 ml suiwer dichlorometaan op 'n ander filtreerpapier aan te bring. Die filtreerpapierstrookies is individueel gestoor en vervoer in skoon, hittegedroogde glasbottels met geslypte glasproppe.

3.6.2 Toetse van Individuele Fraksies op Honde

Die oplossings van die versamelde fraksies wat met behulp van preparatiewe kapillêre gaschromatografie opgevang is (sien paragraaf 3.5.1), is individueel op strookies filtreerpapier (30 mm x 4 mm) oorgebring en die dichlorometaan is toegelaat om te verdamp. Die minder vlugtige materiaal het op die papierstrookies agtergebly en die papierstrookies is individueel in 5 ml skroefdopflessies gebêre om op die honde te toets.

Die toetse is gedoen deur die strookies papier voor die honde se neuse te hou sodat hulle daaraan kon ruik. Verdere besprekings van hul reaksies volg in Hoofstuk 4.

3.6.3 Toets van Sintetiese Mengsel

Heptanaal, nonanaal en dekanaal is gesintetiseer soos beskryf in Afdeling 3.7.1. terwyl heksanaal en oktanaal kommersieel beskikbaar was. 'n Mengsel van aldehyede in dieselfde verhouding as wat in die natuurlike ekstrak, soos verkry deur middel van analyses met normale GC-inspuiting (Afdeling 3.4.1) asook oplosmiddellose monsterneming (Afdeling 3.4.6), gevind is, is voorberei in dichlorometaan as oplosmiddel. Die oplossing is verder verdun met dichlorometaan sodat 2.5 μ l ekwivalent sou wees aan die afskeiding van een bosluis ten opsigte van C6- tot C10-aldehyede. Die gespesifiseerde volume van hierdie mengsel is op 'n filtreerpapierrepie aangebring en vir die honde aangebied om te ruik, asook 'n blanko papiertjie, 'n kontrolepapiertjie wat slegs dichlorometaan bevat en 'n papiertjie met ekstrakmonster ekwivalent aan die afskeiding van een bosluiswyfie.

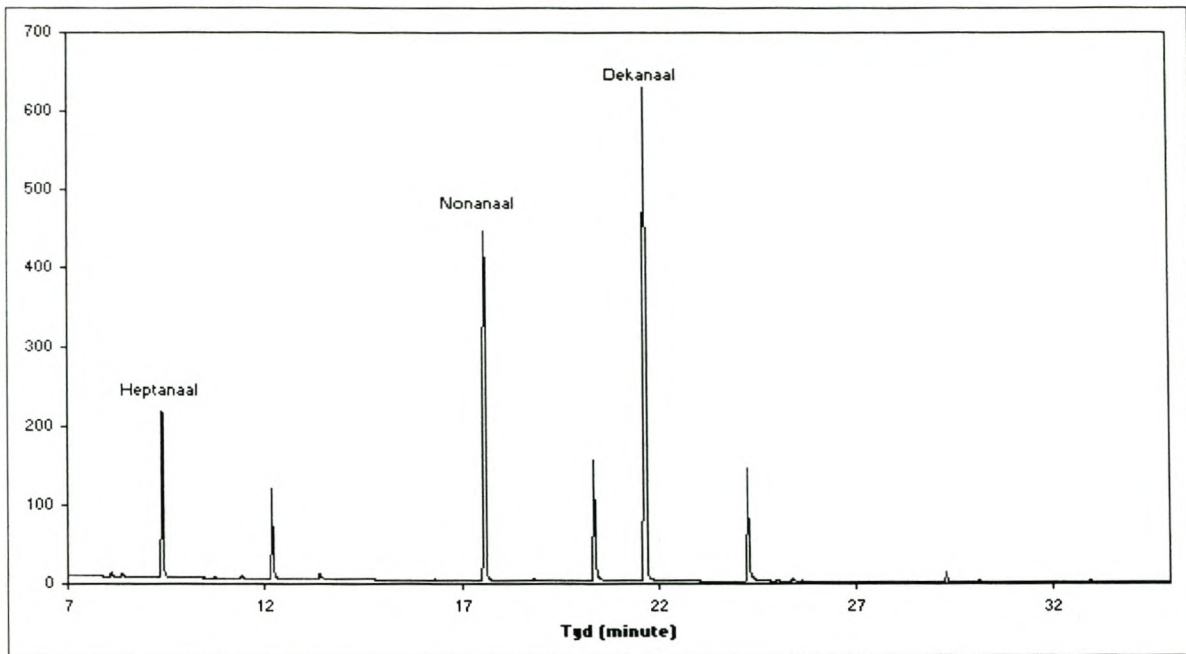
Om te bevestig dat die teenwoordigheid van die aldehyede in die afskeiding van die wyfiebosluis wel verantwoordelik is vir die hondafwerende werking, is 2.5 μ l van die sintetiese aldehydemengsel (ekwivalent aan een bosluis) op 'n filtreerpapierrepie aangebring. Elke hond is twee papiertjies aangebied: een met die aldehyede en een met slegs dichlorometaan as kontrole. Hierdie toets is met 30 honde van verskillende rasse uitgevoer.

3.7 Sinteses

Al die chemikalieë wat gebruik is in die sinteses is verkry van Aldrich Chemical Co., Merck, Saarchem, of NT Laboratories of B.D.H. Chemicals Ltd.. Verbindings wat benodig is vir die bevestiging van die strukture van die komponente in die afskeiding van die geelhondebosluis wat nie kommersieel beskikbaar was nie, is gesintetiseer uit oorspronklike uitgangstowwe vir die vergelyking van retensietye. Drie aldehyede, naamlik heptanaal, nonanaal en dekanaal, is ook gesintetiseer om tyd te bespaar vir die biologiese evaluering op honde, aangesien verbindings wat bestel word, tot 'n paar weke kan neem om afgelewer te word.

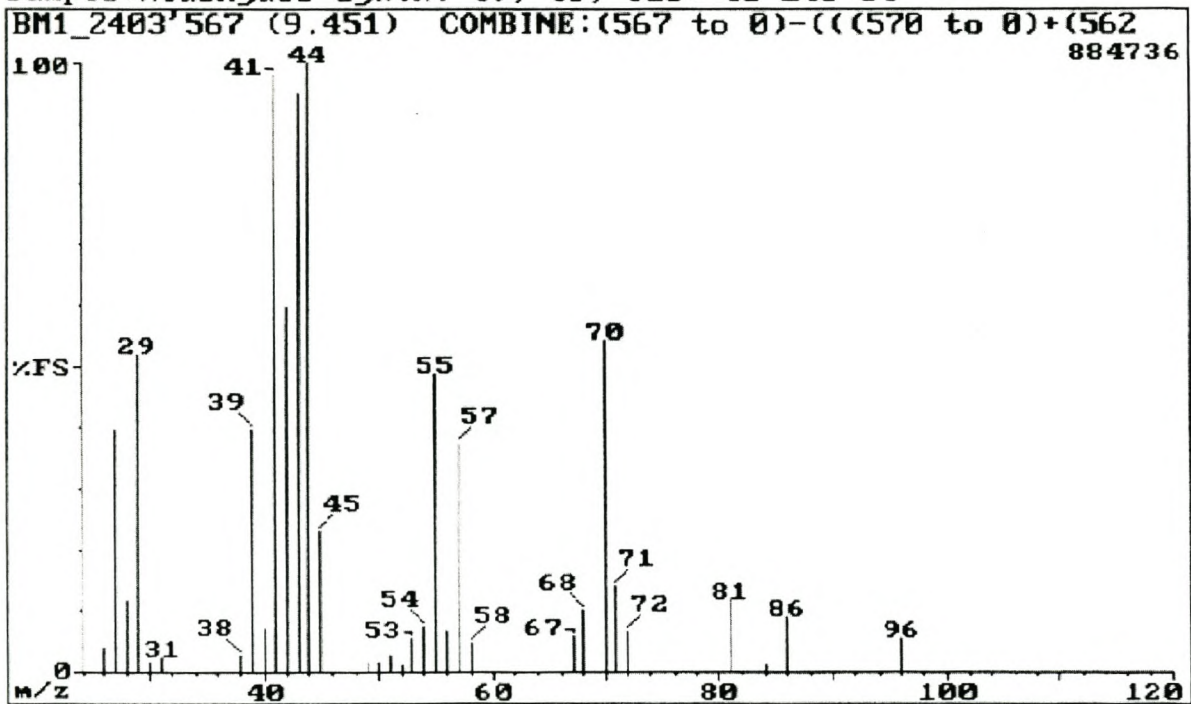
3.7.1 Aldehyede: Heptanaal, Nonanaal, Dekanaal

Hierdie aldehyede is tegelyketyd gesintetiseer deur middel van oksidasie van alkohole met behulp van Fetizon se reagens². Laasgenoemde is voorberei deur silwerkarbonaat op 15 g Celite[®] te presipiteer deur die gewasde en gedroogde Celite[®] by silwernitraat (17.0 g, 0.1 mol) wat in gedistilleerde water opgelos is, te voeg terwyl die mengsel deurgans meganies geroer is. Daarby is 15.0 g (53 mmol) natriumkarbonaat-dekahidraat wat in 150 ml gedistilleerde water opgelos is, drupsgewys bygevoeg. Na die byvoeging is die mengsel vir 'n verdere 10 minute geroer. Die ligte lemmetjiegroen neerslag is deur middel van vakuumfiltrasie versamel, waarna dit met behulp van rotasieverdamping vir 'n verdere twee uur gedroog is. Hierdie reagens het ongeveer 2 mmol silwerkarbonaat per gram bevat. Vir die oksidasie van die alkohole is 'n mengsel van heptanol (39 mg, 0.3 mmol), nonanol (48 mg, 0.3 mmol) en dekanol (53 mg, 0.3 mmol) by 'n suspensie van 3.5 g (*ca.* 7 mmol) Fetizon se reagens in 25 ml gedroogde toluen gevoeg, waarna die mengsel vir ses uur onder reflux verhit is. Die suspensie is gefiltreer en die vaste stowwe is met drie porsies van 5 ml metileenchloried gewas. Die gekombineerde filtraat en metileenchloried waarmee die residu gewas is, is toegelaat om met behulp van rotasieverdamping af te damp. Daar is deur middel van GC-MS-analise bepaal dat 63.6% heptanaal uit die heptanol, 75.6% nonanaal uit die nonanol en 85.3% dekanaal uit die dekanol verkry is met 'n totaal van 1.5% ander onsuiverhede. Die resulterende TIC verskyn in Figuur 3.2. Die massaspektra van heptanaal, nonanaal en dekanaal word onderskeidelik in Figure 3.3 tot 3.5 gegee.



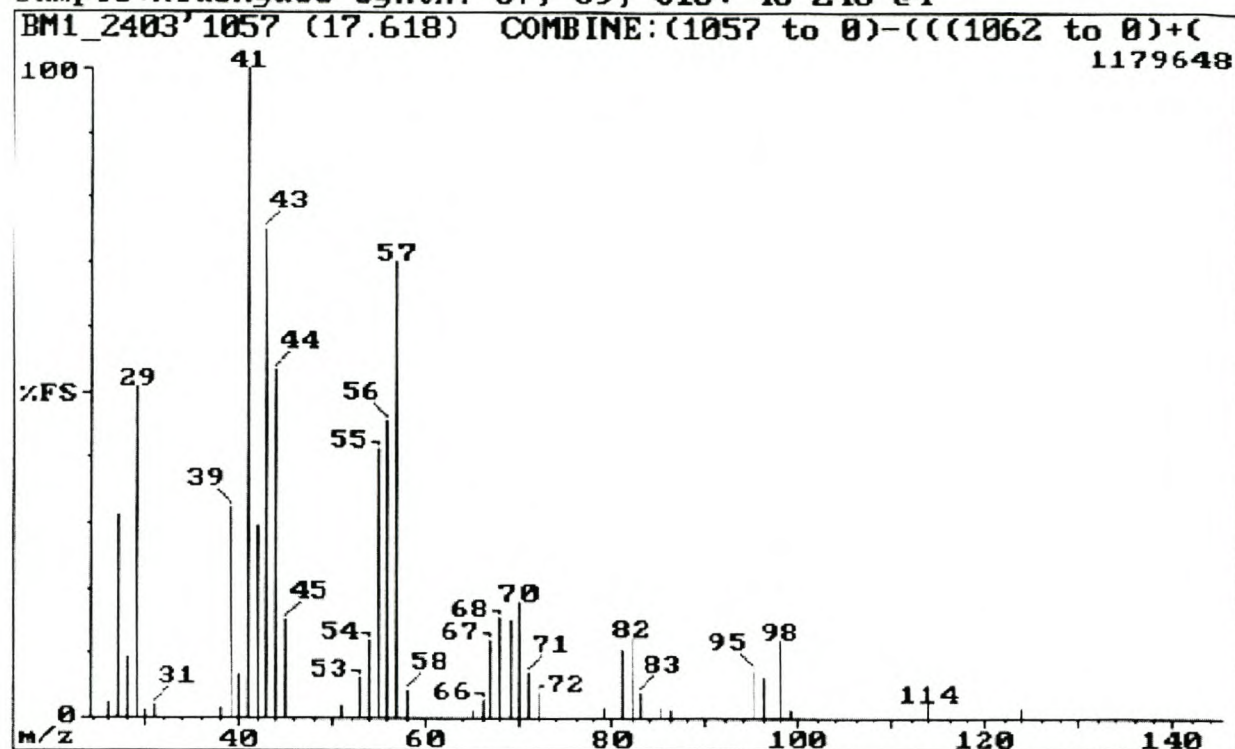
Figuur 3.2. Totale ionstroomchromatogram (TIC) van die mengsel van aldehyede wat deur oksidasie uit die ooreenstemmende alkohole berei is.

Sample: Aldehydes synth. C7, C9, C10: 40-240 04



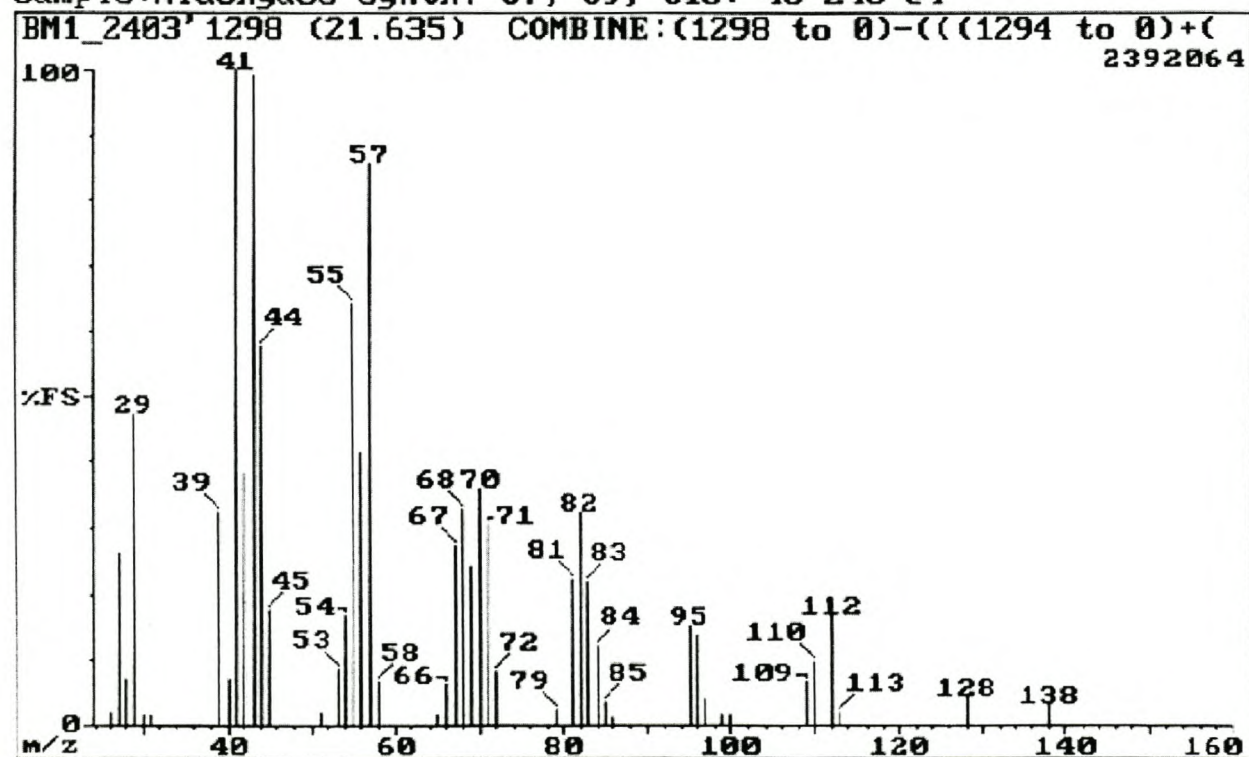
Figuur 3.3. EI-massaspektrum van heptanaal wat met behulp van Fetizon se reagens gesintetiseer is.

Sample: Aldehydes synth. C7, C9, C10: 40-240 04



Figuur 3.4. EI-massaspektrum van nonanaal wat met behulp van Fetizon se reagens gesintetiseer is.

Sample: Aldehydes synth. C7, C9, C10: 40-240 04



Figuur 3.4. EI-massaspektrum van dekanaal wat met behulp van Fetizon se reagens gesintetiseer is.

Verwysings: Hoofstuk 3

1. B.V. Burger, M. le Roux, Z.M. Munro en M.E. Wilken, *J. Chrom.* **552**:137 (1991).
2. L.M. Harwood, C.J. Moody en J.M. Percy, "Experimental Organic Chemistry, Standard and Microscale", 2^e uitgawe, Blackwell Science Ltd., pp. 513-515 (1999).

Hoofstuk 4

Resultate en Bespreking van Verskillende Monsternemingsmetodes en Toetse op Honde

In Hoofstuk 3 is die eksperimentele metodes wat in hierdie navorsingsprojek gebruik is, beskryf. Slegs konvensionele analitiese instrumentasie was vir die navorsing beskikbaar wat gelei het tot sekere probleme wat oorbrug moes word. Dit het gou geblyk dat die bosluise die afweerstof in uiters klein hoeveelhede afskei, dat die kutikulêre afskeidings van die diertjies uit 'n komplekse mengsel van meestal onbekende verbindings bestaan en dat die kapillêre gaschromatografiese kolomme tot so 'n mate deur die ekstrakte kontamineer word dat hulle skeidingseffektiwiteit baie vinnig afgeneem het en dus onbetroubare gegewens gelever het. Daar is probeer om die eerste een van hierdie probleme te oorbrug deur verskillende monsternemings- of monsterverrykingsmetodes aan te wend.

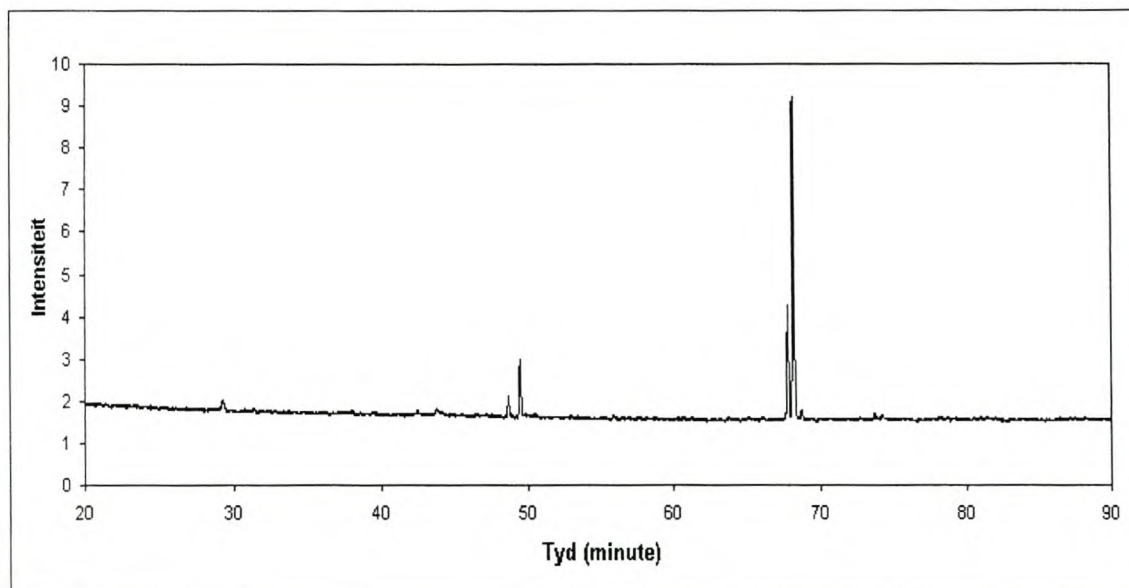
4.1 Monsterverryking met behulp van SPME

Soliede-fase mikroekstraksie (solid phase micro-extraction; SPME) is gedurende die afgelope dekade deur Pawlyszyn¹ en sy medewerkers ontwikkel en dit word tans wêreldwyd as 'n baie gerieflike metode vir die bepaling van vlugtige organiese verbindings (VOV's) aangewend. Dit kan in bodampanalise asook vir die direkte ekstraksie van VOV's uit vloeistowwe gebruik word en berus op die ekstraksie van VOV's uit die gas- of vloeistoffase met behulp van sorpsie in 'n dun vesel bedek met 'n geskikte stasionêre fase, gevolg deur die desorpsie van die VOV's in die inlaat van 'n gaschromatograaf. Omdat daar in sekere kringe bedenkinge bestaan oor die betroubaarheid van die metode vir kwantitatiewe doeleindes, word dit meestal vir kwalitatiewe werk gebruik. 'n Verdere probleem is die relatief lae verrykingsfaktor wat

behaal kan word omdat die VOV's in slegs 'n uiters klein volume (of massa) stasionêre fase opgevang word. Daar is nogtans pogings aangewend om die afskeidings van die bosluis op hierdie manier vir GC analise te verryk. Hierdie tipe monsternemingsmetode is veral in die huidige ondersoek as aangewese beskou omdat hoofsaaklik hoogs vlugtige verbindings verryk word sodat dit onwaarskynlik is dat die kolomme deur swaar materiaal beskadig sou word.

In 'n poging om verbindings met afweerwerking in die bosluisafskedings te vind, is die afskeidings van geïrriteerde en nie-geïrriteerde bosluiswyfies vergelyk deur van bodampanalise met behulp van SPME gebruik te maak. Daar is geoordeel dat die verskyning van “sweetdruppeltjies” op die liggame van geïrriteerde bosluise 'n teken kan wees dat die bosluis die afweerstof afskei.

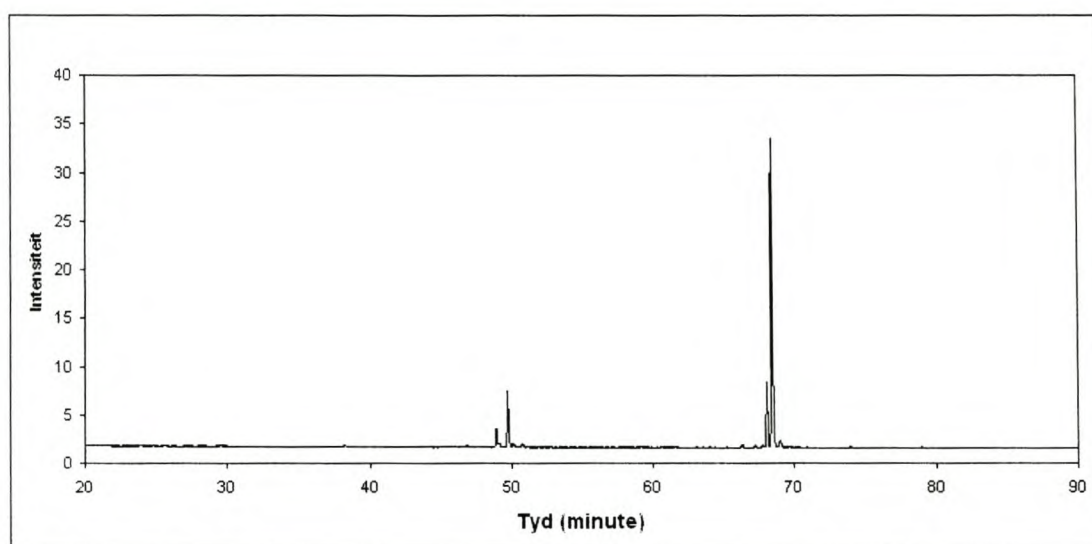
In Figuur 4.1 verskyn 'n totale ioonstroomchromatogram (TIC) wat deur 'n bodamp analise van 10 nie-geïrriteerde bosluise verkry is.



Figuur 4.1. Totale ioonstroomchromatogram (TIC) verkry deur SPME analise van die bodamp van 10 nie-geïrriteerde *H. leachi* wyfies. *

* Al die gaschromatografiese parameters wat gebruik is in die analises wat in hierdie hoofstuk bespreek word, word in Hoofstuk 3 gegee.

Die herhaling van die eksperiment onder identiese kondisies met geïrriteerde bosluiswyfies het die TIC in Figuur 4.2 gelewer. Dit is duidelik dat daar wel 'n verskil is ten opsigte van die hoeveelhede van die verbindings wat van die geïrriteerde teenoor nie-geïrriteerde bosluise met behulp van SPME versamel is. Die geïrriteerde bosluise het skynbaar vier maal meer afskeiding geproduseer.



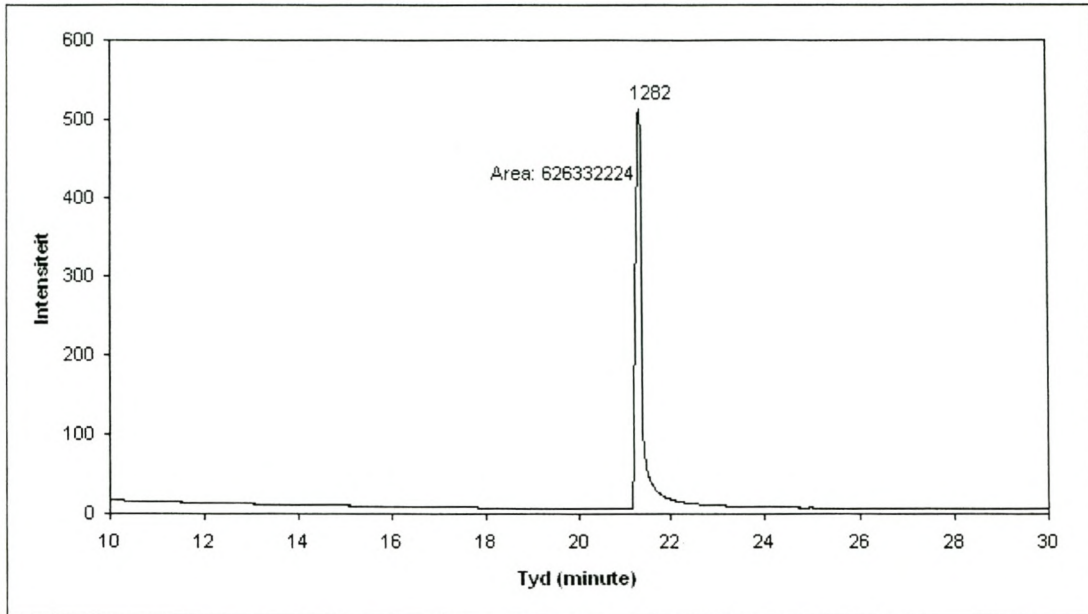
Figuur 4.2. TIC verkry deur SPME analise van die bodamp van 10 geïrriteerde *H. leachi* wyfies.

4.2 Monsterverryking deur Adsorpsie op Geaktiveerde Koolstof

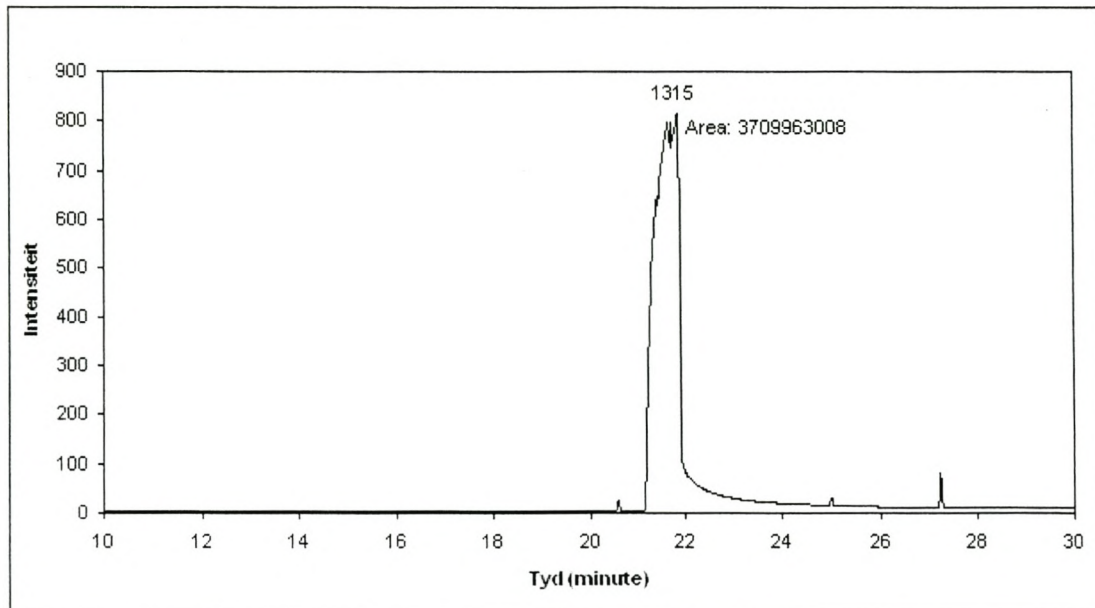
Monsterneming deur adsorpsie op geaktiveerde koolstof is baie riskant aangesien die gehalte van geaktiveerde koolstof uit verskillende bronne ten opsigte van die materiaal se vermoë om chemikalieë van verskillende verbindingstipes en molekulêre groottes te adsorbeer, baie kan verskil. Omdat daar in die verlede soms uitstekende resultate met hierdie materiaal in die Laboratorium vir Ekologiese Chemie behaal is, is besluit om vas te stel of aanvaarbare resultate nie moontlik in hierdie projek daarmee behaal sou kon word nie. Daar is aangeneem dat die aktiewe koolstof wat in filtersigarette gebruik word

moontlik goeie resultate kan lewer en die materiaal wat vir die filters van Ransom Select gebruik word, is vir hierdie doel aangewend. 'n Koolstofbelaagde stafie (KBS) wat in sekere opsigte met 'n SPME vesel vergelyk kan word, is vervaardig soos in Hoofstuk 3 beskryf en die aktiwiteit van die KBS is getoets deur metielsalisilaat toe te laat om vir 1 uur op die aktiewe koolstof te adsorbeer. Om pirolise van geadsorbeerde materiaal tydens termiese desorpsie te vermy is die materiaal met behulp van 40 μl dichlorometaan gedesorbeer². As aanvaar word dat 10 μl van die oplosmiddel deur die aktiewe koolstof teruggehou word (benatting van die materiaal) en 1 μl van die herwinde 30 μl metielsalisilaatekstrak vir 'n GC analise gebruik is, het 'n vergelyking van die resultate wat in hierdie eksperiment behaal is met dié van 'n SPME analise onder identiese kondisies, getoon dat nagenoeg 5 maal soveel metielsalisilaat op die aktiewe koolstof versamel is as in die SPME. In hierdie eksperiment is 'n SPME vesel belaag met 100 μm polidimetieelsiloksaan gebruik. Die resultate word in Figure 4.3 en 4.4 geïllustreer.

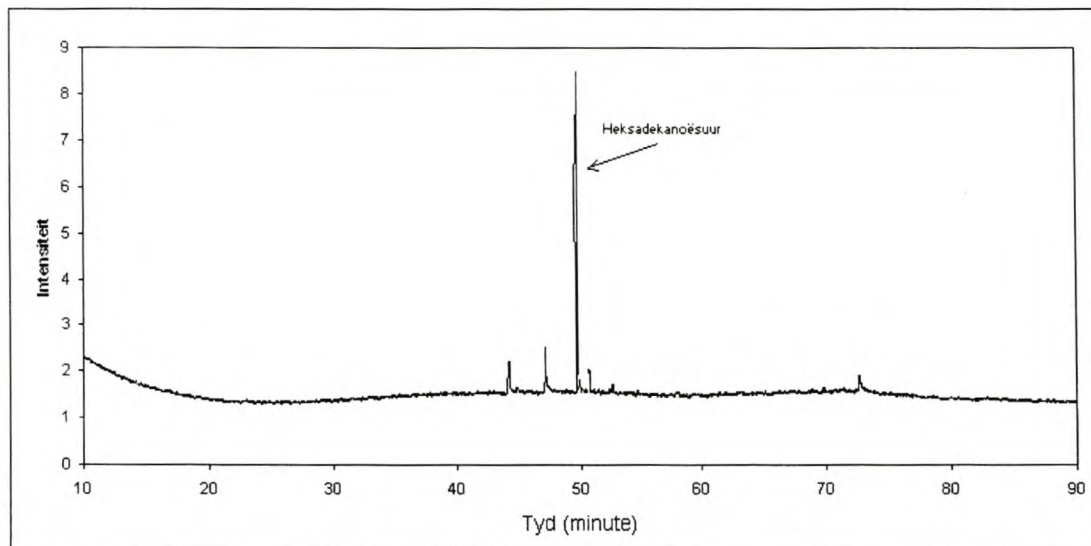
In die lig van hierdie resultate is die volgende eksperiment uitgevoer: VOV's is toegelaat om vir 60 minute uit die bodamp van 10 geïrriteerde bosluiswyfies op die aktiewe koolstof te adsorbeer in 'n botteltjie met 'n prop wat gemodifiseer is om die aktiewe koolstof instrument te akkomodeer (Hoofstuk 3, Afdeling 3.3.1). Die geadsorbeerde materiaal is weer met behulp van dichlorometaan gedesorbeer. In die chromatogram wat van die geïrriteerde bosluise met behulp van die aktiewe koolstofinstrument verkry is (Figuur 4.5), is die mees prominente pieke dié van ontbindingsprodukte van die stasionêre fase, met heksadekanoësuur as uitsondering, soos in die chromatogram aangedui. Dit was duidelik dat adsorpsie op geaktiveerde koolstof nie die aangewese metode vir die versameling van die vlugtige komponente van die afskeiding was nie en dat hierdie metode nie genoegsaam verbeter sou kon word om uiteindelik aanvaarbare resultate te lewer nie.



Figuur 4.3. TIC van metielsalisilaat wat op die KBS geadsorbeer en met behulp van dichlorometaan gedesorbeer is. Hierdie resultaat is met 'n dertigste (ongeveer 3%) van die geadsorbeerde materiaal verkry.



Figuur 4.4. TIC van metielsalisilaat verkry in 'n normale SPME analise.



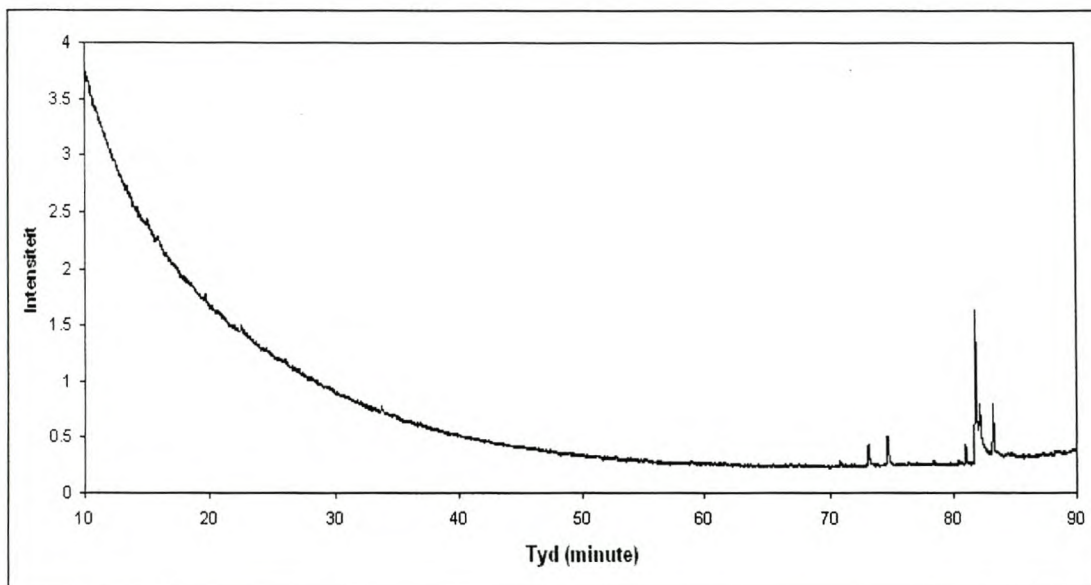
Figuur 4.5. TIC van die VOV's verryk uit die bodamp van 10 geïrriteerde bosluiswyfies met behulp van die KBS.

4.3 Kriopresipitasie van Vluchtige Komponente

In beginsel kan vluchtige verbindings uit 'n stroom lug of inerte gas wat oor geïrriteerde bosluiswyfies vloei, gepresipiteer word deur die buis waardeur die gas (draergas) vloei tot 'n geskikte lae temperatuur af te koel. Hierdie metode kan as kriopresipitasie van VOV's beskryf word. Hierdie metode word egter selde gebruik om die vluchtige verbindings wat deur lewende organismes afgeskei word te versamel aangesien die produksie van die vluchtige verbindings feitlik sonder uitsondering met die afskeiding van water gepaard gaan. Met afkoeling tot temperature benede vriespunt vorm ys in die buis waardeur die draergas vloei en word die vloei redelik gou deur die ysprop geblokkeer. In baie gevalle word die vloei so gou afgesluit dat 'n baie geringe verryking van die VOV's verkry word. Enkele pogings is nogtans aangewend om die VOV's op hierdie manier uit die bodamp van geïrriteerde bosluiswyfies te konsentreer. In die eerste eksperiment is

suiwer stikstof as draergas en vaste CO₂ (droë ys) as afkoelmiddel gebruik. In 'n volgende eksperiment is helium as draergas en vloeibare stikstof as afkoelmiddel gebruik.

Soos in Figure 4.6 en 4.7 gesien kan word, was hierdie eksperimente egter onsuksesvol. Aanvanklik is gedink dat ysvorming 'n moontlike rede hiervoor mag wees. Hierdie rede mag dalk 'n bydraende faktor gewees het, maar die werklike rede waarom die eksperiment misluk het, naamlik die sensitiwiteitskwessie, word in Afdeling 4.7 (Gevolgtrekkings Aangaande Monsternemingsmetodes) bespreek.

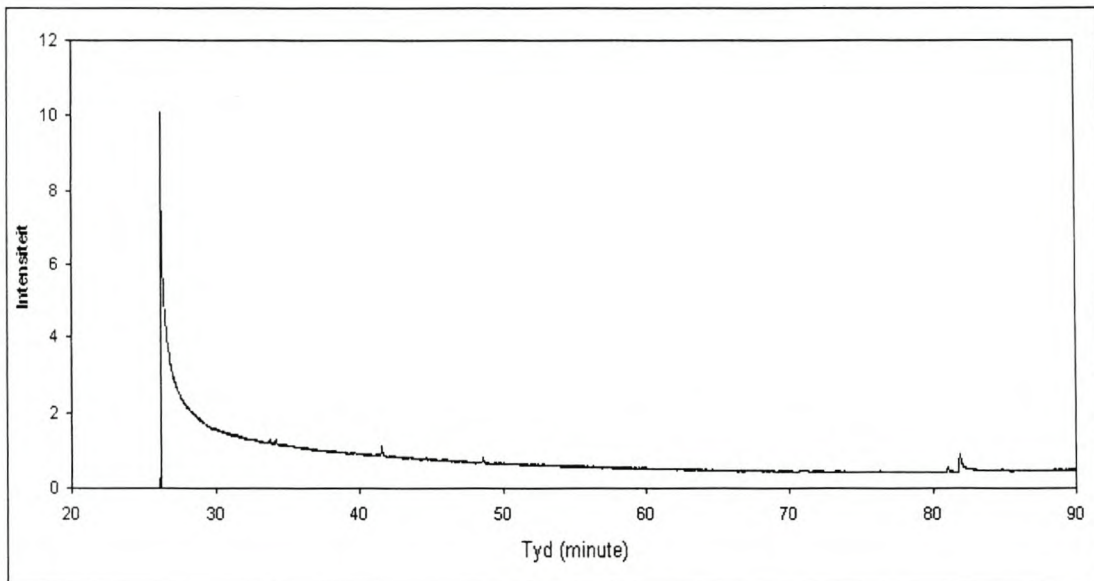


Figuur 4.6. Die TIC van die materiaal wat deur kriopresipitasie uit die bodamp van 10 geïrriteerde bosluiswyfies verkry is met stikstof as draergas en droë ys as afkoelingsmedium.

4.4 Monsterverryking deur Sorpsie in 'n Fase-Belaagde Oopbuisval

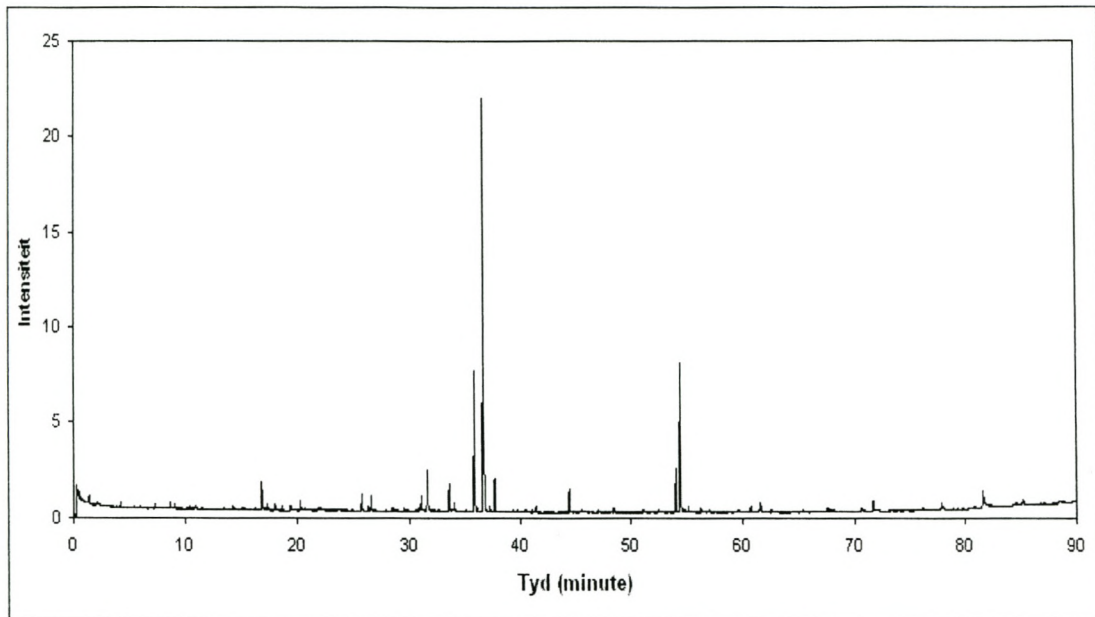
In Figure 4.8 en 4.9 word die onderskeie TIC's wat verkry is met die twee eksperimente, soos verduidelik in Hoofstuk 3, gegee. Hoewel daar in beide gevalle ooreenstemmende TIC's met meer as 40 pieke verkry is, was die herwinning in beide gevalle nie goed

genoeg om veel van die verbindings te kon identifiseer nie. Dit is ook egter ironies dat die tweede eksperiment, met die langer ekstraksietydsduur (30 minute), selfs 'n laer effektiwiteit toon as dié met die korter (15 minute) ekstraksietyd.

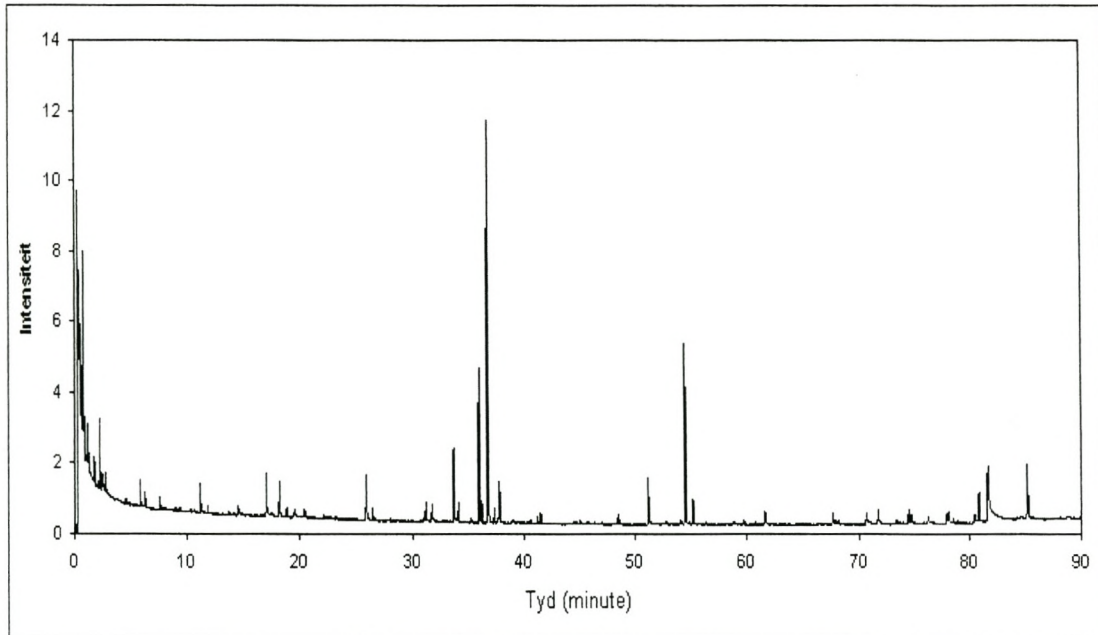


Figuur 4.7. TIC van die materiaal wat deur kriopresipitasie uit die bodamp van 10 geïrriteerde bosluiswyfies verkry is met helium as draegas en vloeibare stikstof as afkoelingsmedium.

Die spektra verkry in beide analyses was so swak dat baie ione klaarblyklik nie die drempelwaarde vir deteksie kon bereik nie. Die gevolg was dat ione wat minder volop is, maar met ander versamelingsmetodes wel waargeneem kon word, in hierdie geval glad nie aanwesig is nie. Die beskikbare inligting wat verkry is, was dus feitlik waardeloos. Daar is egter gevind dat molekules wat moontlik aan 'n homoloë reeks sou kon behoort, dieselfde tipe massaspektra het. Die molekulêre ione, asook die ander minder volop ione, was in hierdie gevalle ook nie sigbaar nie, en geen strukturele gevolgtrekkings kon dus gemaak word nie.



Figuur 4.8. Monsterverryking deur sorpsie vir 15 minute uitgevoer met 'n fase-belaagde oopbuisval



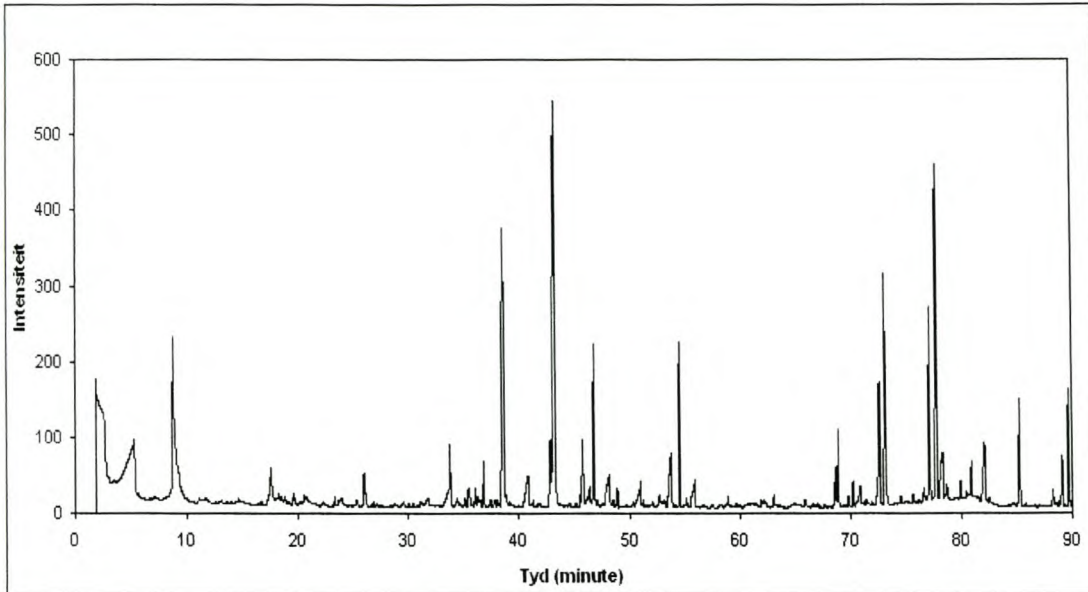
Figuur 4.9. Monsterverryking deur sorpsie vir 30 minute in 'n fase-belaagde oopbuisval.

4.5 Oplosmiddelvrye Monsterinlaatmetodes

Die beste metode om die maksimum hoeveelheid materiaal vir gaschromatografiese analise op 'n kolom aan te bring is om die materiaal in die inlaat, of selfs direk in die kolom, te plaas sonder om dit in 'n oplosmiddel op te los, of sonder om die vlugtige komponente selektief met behulp van die metodes wat hierbo bespreek is, te verryk. Voorbeelde van so 'n oplosmiddelvrye monsterinlaatmetode is die desorpsie van 'n insekferomoon direk uit die klierweefsel deur die klier in die binnebuiss van die gaschromatograaf se inlaat te plaas en tot by 'n geskikte temperatuur te verhit³, asook die desorpsie van vlugtige komponente uit die eksokriene afscheidings van groter diere⁴. Hierdie metodes is vanselfsprekend taamlik brutaal en moet met groot omsigtigheid gebruik word, omdat die komponente van die afscheidings met mekaar of met die water in die afscheidings kan reageer terwyl die gaschromatografiese kolom sulke behandeling nie altyd lank oorleef nie. As gevolg daarvan dat die afweerstofproduserende kliere van die bosluis mikroskopies klein is, sou hierdie metode egter nie in die huidige ondersoek gebruik kon word nie.

Soos reeds genoem, is aangeneem dat die verskyning van “sweetdruppeltjies” op die liggame van geïrriteerde bosluise 'n aanduiding is dat die afweerstof afgeskei word. Hierdie “sweetdruppeltjies” is op mikroglasveselpapier versamel en oplosmiddelvry in die inlaat van die GC-MS-sisteem geplaas, gedesorbeer en ontleed. Figuur 4.10 is 'n TIC wat op hierdie manier verkry is. Wat hierdie eksperiment so indrukwekkend maak, is die feit dat slegs twee bosluise gebruik is om die betrokke TIC te verkry.

Hierdie is waarskynlik die mees effektiewe metode wat gebruik is, omdat daar 'n redelike groot hoeveelheid suiwer monstermateriaal toegedien kan word vir analise en 'n sterk TIC met massaspektra wat vir verdere interpretasie gebruik kon word, verkry is.

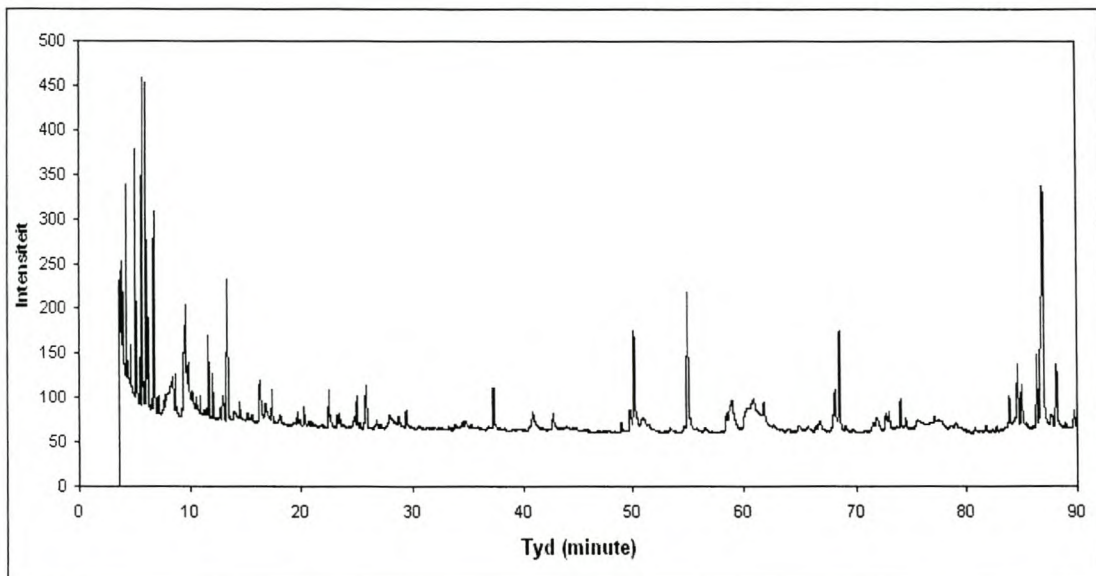


Figuur 4.10. TIC van die afseiding van *Haemaphysalis leachi* opgevang op mikroglasvesel filtreerpapier.

4.6 Monsterinspuitmetodes

Konvensionele monsterinspuitmetodes met en sonder inlaatstroomverdeling is reeds in Hoofdstuf 3 beskryf. In die geval van hierdie studie is die inlaatmetode sonder inlaatstroomverdeling eerder gebruik, omdat, wanneer daar van monsterinlaatmetodes met inlaatstroomverdeling gebruikgemaak word, 'n groter fraksie van die monsterinspuitvolume uit die inlaat ontsnap en 'n kleiner hoeveelheid monster dus uiteindelik die kolom vir chromatografie bereik. Al die oplosmiddel is nie uit ekstrakte afgedamp nie omdat toenemend meer vlugtige komponente saam met die oplosmiddel afgedamp word teen die einde van so 'n konsentrasieproses. Relatief groot, maar nogtans aanvaarbare monsters van 2.5 μl is dus per analise van hierdie gekonsentreerde ekstrakte gebruik. Berekeninge toon naamlik dat 2.5 μl dichlorometaan by 220°C en 'n inlaatdruk van 50 kPa 'n dampvolume van 1.06 ml lewer, wat nog steeds binne-in die binnebuys van die inlaat geakkomodeer kan word. Figuur 4.11 is 'n TIC wat met inlaat sonder inlaatvloei-verdeling verkry is. Die metode is dus klaarblyklik redelik aanvaarbaar. Dit is

interessant om daarop te let dat die twee profile van die TIC's in Figure 4.10 en 4.11 duidelik van mekaar verskil wat betref die relatiewe konsentrasies van die vlugtige en minder vlugtige verbindings wat met behulp van die twee metodes waargeneem is. Daar kan nie sonder meer 'n aanvaarbare verklaring vir hierdie verskille aangebied word nie, behalwe vir die onwaarskynlike moontlikheid dat die vlugtige verbindings baie vinnig van die mikroglasveselpapier verdamp het voordat die papier in die inlaat van die GC-MS-sisteem geplaas kon word.



Figuur 4.11. TIC van die gekonsentreerde ekstrak van geïrriteerde *Haemaphysalis leachi* wyfies.

4.7 Gevolgtrekkings Aangaande Monsternemingsmetodes

Uit die bostaande is dit duidelik dat die twee mees effektiewe metodes die oplosmiddelvrye inlaat van die afscheidings van die bosluise met behulp van glasveselpapier en die konvensionele inlaat of inspuut van 'n ekstrakmonster van die afskeiding sonder inlaatstroomverdeling is.

Die monstertoediening sonder oplosmiddel is egter nie algemene GC-praktyk nie. Dis moeilik om die grootte van monsters te beheer en retensietye is nie só herhaalbaar soos met ekstrakte wat oplosmiddel bevat nie omdat die draergasvloeï onderbreek moet word en die drukreguleerder nie daarna altyd presies dieselfde draergasdruk en -vloeï lewer nie.

In Hoofstuk 1 is genoem dat die mens se neus vir sommige verbindings meer sensitief is as die mees sensitiewe detektor. 'n Hond se reuksintuig kan selfs tot 'n miljoen keer so sensitief wees as dié van 'n mens. Dit is dus nie verbasend dat ten minste 100 bosluise nodig was om genoeg materiaal te ekstraheer vir waarneming op 'n gaschromatograaf-detektor, en dat die ander analitiese metodes wat met 40, 10 en minder bosluise uitgevoer is, moontlik so onsuksesvol was nie. Die verbasende effektiwiteit van die mikroglasvesel monstertoedieningsmetode sonder oplosmiddel word weereens hierdeur beklemtoon. 'n Moontlike verklaring hiervoor kan wees dat die verbindings wat verantwoordelik is vir die beskadiging van die gaschromatograafkolomme, byvoorbeeld polêre molekules soos polihidroksiverbindings of langketting-vetsure, tydens afspoeling die meer vlugtige komponente terughou, sodat alles nie deur die dichlorometaan geëkstraheer word nie. Hierdie verbindings is moontlik verantwoordelik vir die geleidelike vrystelling van die vlugtige afweerverbindings, wat andersins waarskynlik onmiddellik sou verdamp en die bosluise noodsaak om veel groter volumes van die materiaal te produseer. Met die mikroglasveselmetode kan hierdie draermateriaal ook deur die papiertjie opgeneem word waar die vlugtige verbindings termies van die minder vlugtige komponente gedesorbeer word.

'n Interessante maar onverklaarbare waarneming wat ook genoem kan word, is dat daar in die TIC wat sonder inlaatstroomverdeling verkry is, geen aanduiding van die teenwoordigheid van heksadekanoësuur is nie, terwyl dit een van die mees prominente pieke is in die chromatogramme wat deur middel van die SPME-, die KBS en die fase-belaagde oopbuisval-metodes verkry is. Ander karboksiësure, naamlik tetradekanoësuur, heptadekanoësuur en oktadekanoësuur, is egter wel in die eersgenoemde chromatogram

teenwoordig. Heksadekanoësuur is wel aanwesig in die TIC wat met behulp van mikroglasveselpapierversameling verkry is.

4.8 Eksperimente met Ekstrakte van die Kutikulêre Afskeidings

Dit is vanselfsprekend makliker om lokstowwe op diere te toets as afweermiddels, omdat lokmiddels 'n aangename geur vir die ontvanger is, en die dier dit nie kan verhelp om positief te reageer op die stimulus nie. Die gebruik van honde as "lewende detektore" was waarskynlik die grootste probleem in hierdie ondersoek. Daar is aanvanklik uit onkunde aanvaar dat alle honde op 'n eenvoudige, maklik waarneembare en interpreteerbare wyse "positief" of "negatief" op die konfrontasie met toetsmonsters sou reageer. Dit het egter geblyk dat die reaksie van honde deur 'n hele spektrum van faktore beïnvloed word. Die mees steurende faktor is die feitlik allesoorheersende reaksie van sommige honde op die aandag wat hulle tydens die toetsprosedure ontvang. Dit het ook geblyk dat honde wat buitengewoon goed versorg word en wat nog nie met volgesuigde bosluise besmet was nie, nie 'n besonder negatiewe reaksie op die konfrontasie met ekstrakte van die bosluisafskedings getoon het nie. Die mees betroubare resultate is behaal met honde met 'n rustige geaardheid, soos byvoorbeeld die Corgi en Labrador. Selfs met hierdie rasse kan toetswerk geweldig moeilik wees. Die hond moet kalm genoeg wees om stil te sit sodat die reuktoetsmonster voor sy neus gehou kan word sonder dat die hond daarna hap of daaraan probeer lek. Geen betroubare afleidings kan ook gemaak word wanneer die hond te opgewonde is oor die aandag wat hy kry nie. Soms is die hond te rustig of moeg en sal slegs sy neus wegdraai van die aktiewe reukmonster. Die hond moet ook geïnteresseerd wees, aangesien die gedrag van 'n hond wat sy neus sou wegdraai vanweë 'n gebrek aan belangstelling, moontlik as 'n subtiële afweerreaksie geïnterpreteer sou kon word, wat nie noodwendig die geval sou kon wees nie.

Dit is nog nie bekend of die *hond-afwerende* werking van die allomoon berus op 'n slegte reuk, 'n nare ervaring (moontlik deurdat 'n walglik-smakende bosluis gebyt of gekou is)

wat met die reuk geassosieer word, of die algemene chemiese gewaarwording van honde nie, maar hierdie aspek kan as 'n interessante tema vir verdere studies dien.

Aanvanklik is die effek van 'n ekstrak van die kutikulêre afskeiding van *Amblyomma hebraeum* op honde getoets. Geen aanduiding van enige onaangenaamheid vir die honde is opgemerk nie. Die honde het, intendeel, die papiertjies begin eet asof dit lekkernye was. *Amblyomma hebraeum* voed gewoonlik nie op honde nie en kom nie natuurlik in die Stellenbosch-area, waar al die toetse op die honde gedoen is, voor nie.

Saam met die geelhondebosluise is daar dikwels ook hondehokbosluise, *Rhipicephalus sanguineus*, ontvang. Hulle is geskei van die geelhondebosluise en, soos met die *H. leachi*, met dichlorometaan afgespoel en die ekstrakte op honde by Stellenbosch se hondeskut getoets. Geen afwerende werking is opgemerk nie.

Met die toets van die ekstrakte van die kutikulêre afskeiding van *Haemaphysalis leachi* ekstrakte, is onmiddellik opgemerk dat sommige van die honde deur die reuk geaffekteer is. Die eerste teken van naardheid was dat hulle begin kwyl het, en kort daarna in die lug en na gras begin hap het.

4.8.1 Eksperimente met Fraksies van die Kutikulêre Afskeidings

Met behulp van preparatiewe gaschromatografie is ekstrakte van die afskeidings arbitrêr in fraksies geskei, soos beskryf in Hoofstuk 3. Hierdie fraksies is individueel met onder andere 'n Labrador (Gunner) getoets. Ander honde waarmee toetse gedoen is, sluit in dié by die hondeskut, troeteldiere van kennisse en honde wat aan opleidingskursusse deelgeneem het. In sommige gevalle is uiters sterk reaksies verkry deurdat die hond sy kop weggeruk het, sy bek verskriklik gekwyl en die hond selfs weggehardloop het van die papiertjie. Die honde wat sulke sterk reaksies getoon het, het geweier om 'n tweede maal aan enige papiere te ruik en het dit soms nie weer naby die persoon wat die papiertjie aangebied het gewaag nie, ten spyte van pogings om hulle met behulp van

hondebeskuitjies te paai. Verdere toetse met hierdie honde was dus onmoontlik. Die reaksies van die honde was egter meestal baie meer subtiel.

Met die opvangs van subfraksies, wat elk afsonderlik met die honde getoets is, is gevind dat verskeie fraksies wel aktiwiteit getoon het. Alle aktiwiteit is egter binne die fraksies wat in die eerste 25 minute opgevang is, waargeneem. Daar kan geredeneer word dat werklik aktiewe fraksies die daaropvolgende fraksies kon kontamineer om twee moontlike redes:

- a) stertvorming van polêre verbindings op die apolêre kolom kon veroorsaak dat die illusie geskep word dat 'n komponent volledig opgevang is, terwyl die "stert" eers in die volgende fraksie volledig elueer en
- b) die punt van die kolom wat na buite uitsteek en waarvandaan die fraksies opgevang is, is koeler, en verbindings kon dus daar kondenseer voordat dit geleidelik volledig die kolom verlaat, moontlik in latere fraksies. maar deur die eluerende komponente direk weer in oplossing vas te vang, is daardie moontlikheid uitgeskakel. Daar moes dus meer as een aktiewe komponent in die geïsoleerde materiaal wees.

Hierdie probleme is egter uitgeskakel deur die eluerende komponente direk weer in 'n geskikte oplosmiddel op te vang.

Daar is bereken watter volume van elke monster nodig sou wees om die afskeiding van een bosluis te verteenwoordig deur die aantal bosluise waarmee begin is, in ag te neem. Die teoretiese volume is op 'n filtreerpapiertjie aangebring wat na 'n hondeopleidingsessie onder leiding van Mnr. Chris Pretorius geneem is. Vyf honde van verskillende rasse is toegelaat om aan 'n blanko repie filtreerpapier, die papier met die gesuiwerde ekstrak, en 'n kontrole, 'n repie filtreerpapier wat slegs dichlorometaan bevat, te ruik. Die betrokke honde het soortgelyke reaksies getoon: hulle het geen voor- of afkeur vir die kontrole of die blanko gehad het nie, maar het hulle neuse weggeruk van die papier wat die toetsmonster bevat het. Dit het bevestig dat die betrokke fraksie wel aktief was. Die herhaling van preparatiewe skeidings en evaluering van die fraksies het daarop gedui dat 'n reeks aldehiede wat in die afskeiding aanwesig is, en met behulp van

GC-MS bepaal is (Hoofstuk 5), die aktiewe afwerende bestanddele van die afskeiding kan wees.

GC-MS analyses (sien besprekings in Hoofstuk 5) het gelei tot die vasstelling dat daar 'n homoloë reeks van sewe onvertakte aldehyede van heksadekanaal (C6) tot dodekanaal (C12) in die ekstrak teenwoordig is. Om te bepaal of die aldehyede werklik verantwoordelik is vir die afwering van die honde, is daar eers probeer om die aldehyede met behulp van preparatiewe gaschromatografie uit die natuurlike ekstrak te isoleer deur middel van die metode soos in Afdeling 3.5.1 beskryf, gebruik te maak. Die aldehyede is individueel opgevang en gekombineer, terwyl die oorblywende eluantfraksies afsonderlik opgevang en gekombineer is vir kontroletoetsing. Die verkryde fraksies is op die honde getoets, maar die reaksies van die honde was egter baie subtiel, en geen definitiewe afleidings kon hieruit gemaak word nie.

Ter inligting is die ekstrak van *R. sanguineus* onder dieselfde toestande as dié van *H. leachi* geanaliseer met behulp van GC-MS. Daar is gevind dat slegs nonanaal in die ekstrak teenwoordig is. Die afwesigheid van die meer vlugtige aldehyede, heksanaal en heptanaal, in die ekstrak van *R. sanguineus* verduidelik waarom honde geen aversie vir hierdie afskeidings getoon het nie.

4.8.2 Resultate van die Toets van die Sintetiese Mengsel

Die monsters, soos beskryf in Afdeling 3.6.3, is aan evaluering deur onderskeidelik 'n Doberman-Spaniel-gekruisde teef, genaamd Beer, en 'n Rotweiler-Spanielreun, Bruno, onderwerp. Beide honde se reaksies was steeds subtiel, maar volgens die betrokke wetenskaplike, 'n onafhanklike getuie, asook die eienaar van die honde het albei, soos verwag sou kon word, 'n merkbare afkeer in die natuurlike ekstrak getoon. Dieselfde reaksie is met die sintetiese aldehyd-toetsmonster verkry. Dit het as 'n moontlike aanduiding vir die afwerende werking van aldehyede in die afskeiding van bosluise gedien.

As finale bevestiging is 'n totaal van 30 honde aan 'n reuktoets onderwerp waar elkeen 'n papiertjie met die sintetiese aldehydemengsel aangebied is om te ruik. In Tabel 4.1 hieronder word elke hond se reaksie op die toetspapiertjie aangedui. 'n "+"-Teken dui 'n positiewe afwerende reaksie aan en 'n "-"-teken beteken dat die hond geen aversie vir die aldehyede getoon het nie.

Tabel 4.1. Resultate van die evaluering van die afwerende effek van aldehyede op honde.

	Naam	Ras	Uitslag
1	Gunner	Labrador	+
2	Beer	Dobermann X Spaniel	+
3	Bruno	Rotweiler X Spaniel	+
4	Duke	Corgi	+
5	Katy	Scottish terrier	+
6	Stoffel	Corgi	+
7	Bimbo	Labrador	+
8	Lucy	Cocker spaniel	+
9	Gigolo	Basset Hound	+
10	Poppie	Basset Hound	+
11	Vlooi	Fox terrier	+
12	Rex	Labrador	-
13	Tinkels	Maltese poedel	+
14	Nina	Jack Russel	+
15	Meisie	Baster	-
16	Baasjan	Labrador	+
17	Pilot	Bokser	+
18	Jackie	Jack Russel	+
19	Rex	Alaskan Malamute X Wolf	-
20	Rex	Alsatian	+
21	Lady	Border collie	+
22	Wolf	Belgiese herdershond	-
23	Duchess	Belgiese herdershond	+
24	Tequila	Rotweiler	+
25	Syrah	Rotweiler X St. Bernhard/Boerboel	+
26	Cloé	Skaaphond	+
27	Linka	Labrador	+
28	Jackie	Jack Russel	+
29	Rupert	Rifrug	+
30	Jessie	Jack Russel	+

Volgens die toets vir 'n proporsie wat uitgevoer is om te bepaal hoe beduidend hierdie resultate is, sou 'n minimum van 21 honde op 'n positiewe aversie-reaksie dui⁵. Die 26 honde wat aversie toon vir hierdie aldehydmengsel is dus hoogs beduidend.

Uit die voorafgaande resultate is afgelei dat die afweerstof waarskynlik uit 'n mengsel van die aldehyede, heksanaal, heptanaal, oktanaal, nonanaal, dekanaal, undekanaal en dodekanaal, bestaan, hoewel van die ander ongeïdentifiseerde verbindings wat gedurende die eerste 25 minute tydens die gaschromatografiese skeiding elueer die afwerende effek sou kon versterk.

Met hierdie inligting is dit nou ook moontlik om die verskil in die reaksies van verskillende honde op die waarneming van die afweerstof te verklaar. Hoewel die geïdentifiseerde aldehyede moontlik nie 'n aangename reuk het nie, is dit onwaarskynlik dat die reuk as sodanig so 'n uitgesproke negatiewe reaksie by honde sou kon ontlok. Die aldehyede en veral die laer lede van die reeks het egter 'n uiters onaangename branderige sensasie tot gevolg wanneer hulle met die slymvliese van die mondholte in aanraking kom. 'n Hond wat nog nie tevore probeer het om 'n *H. leachi* bosluis met sy tande van sy lyf te verwyder nie, sou nog nie hierdie onaangename ondervinding gehad het nie en sal moontlik nie uitgesproke negatief reageer nie, in teenstelling met 'n hond wat só 'n onaangename ervaring gehad het dat reeds die reuk van die aldehyede genoeg is om die waargenome negatiewe gedragspatroon by die hond te ontlok.

Verwysings: Hoofstuk 4

1. C.L. Arthur en J. Pawlyszyn, *Analchem.* **62**:2145 (1990).
2. B.V. Burger en Z. Munro, *J. Chromatogr.* **402**:95 (1987).
3. B.V. Burger, Z. Munro, D. Smit, U. Schmidt, C-L. Wu en F-C. Tien, *J. Chromatogr.* **518**:207 (1990).
4. B.V. Burger, D. Smit, H.S.C. Spies, C. Schmidt, U. Schmidt en A.Y. Telitsina, *J. Chem. Ecol.* **27**:1277 (2001).
5. A.G.W. Steyn, C.F. Smit, S.H.C. du Toit en C. Strasheim, "Modern Statistics in practice", JL van Schaik Academic, p. 424 (1994).

Hoofstuk 5

Identifisering van Komponente van die Kutikulêre Afskeiding van *Haemaphysalis leachi*

Die verskillende monsternemingsmetodes en analitiese tegnieke wat in Hoofstuk 3 beskryf is, is aangewend om die organiese verbindings wat in die kutikulêre afskeiding van *H. leachi* voorkom, te identifiseer. In Hoofstuk 4 is verduidelik dat sommige van die monsternemingsmetodes baie onbevredigende resultate gelewer het. Die meer suksesvolle monsternemingsmetodes het egter grotendeels ooreenstemmende kwalitatiewe resultate gelewer, hoewel sommige verbindings in sommige monsters in spoorkwantiteite aanwesig en in ander afwesig was. Dit is egter nie onverwags nie, aangesien selfs die omgewing waarin die bosluise versamel is en die dieet van hul gasheerhonde 'n invloed op die kwalitatiewe samestelling van die materiaal wat versamel is sou kon hê, gesien die sensitiwiteit van die metodes wat gebruik is.

Die komponente van die kutikulêre afskeiding is tentatief geïdentifiseer deur vergelyking van hulle massaspektra met verskillende stelle biblioteekspektra, waarna die massaspektra van die natuurlike verbindings vir die moontlike aanwesigheid van verdere strukturele inligting geëvalueer is. Die natuurlike verbindings is vervolgens gaschromatografies en massaspektrometries vergelyk met sintetiese materiaal wat kommersieel beskikbaar is of gesintetiseer is. Gaschromatografiese vergelykings is gedoen deur vas te stel of die gaschromatografiese analise van 'n mengsel van die twee verbindings wat vergelyk word as 'n enkele piek uit die kolom geëlueer word.

In die bespreking van die identifisering van die komponente van die kutikulêre afskeiding word na massaspektra verwys wat in GC-MS analyses verkry is. Om die aanbieding van die inligting te vereenvoudig, word die volgende verkorte skryfwyse gebruik: K398 (T 5.3; MS 5.4) verwys na komponent nommer 398 wat met 'n retensietyd van 398 sekondes

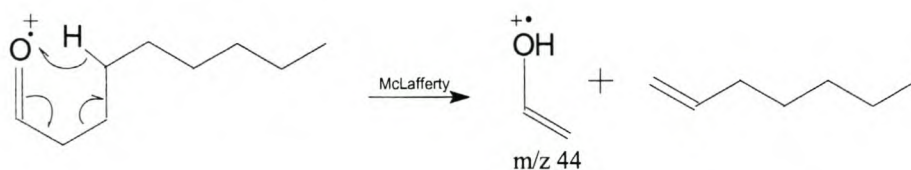
in die TIC wat in Figuur 5.3 verskyn, voorkom en waarvan die massaspektrum in Figuur 5.4 verskaf word.

5.1 Aldehyede: Onvertak

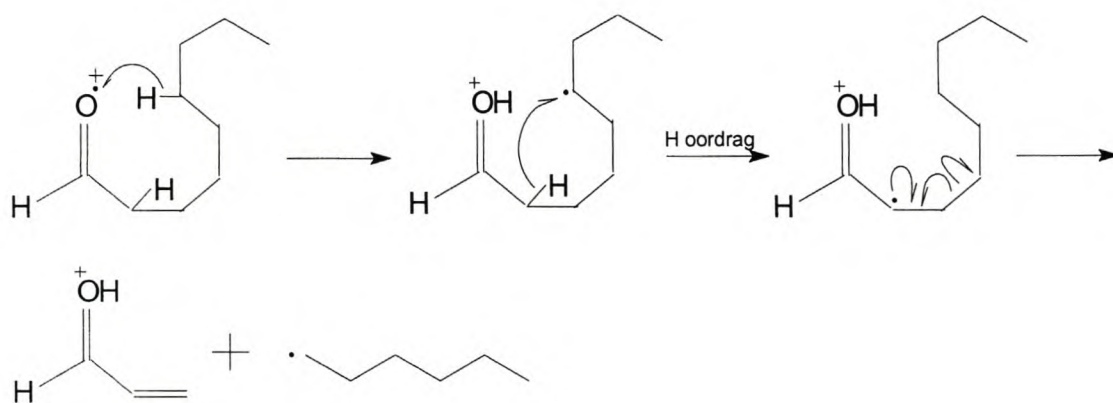
Onvertakte aldehyede met kettings van sewe tot twaalf koolstowwe is in die kutikulêre afskeiding geïdentifiseer. Die EI-spektrum (elektronimpaktspektrum) van K398 (T 5.3; MS 5.4), K1215 (T 5.1; MS 5.5), K1094 (T 5.2; MS 5.6), K2238 (T 5.1; MS 5.7) en K2025 (T 5.2; MS 5.8) het ione by m/z 114, 128, 142 en 156 onderskeidelik. As hierdie ione as die molekulêre ione van 'n homoloë reeks aanvaar word, kan die ione by m/z (M-18) en (M-28) aan die verlies van water en 'n molekule etileen uit die molekulêre ioon toegeskryf word. Die algemene voorkoms van die massaspektra met digte groepering van groepe ione in die gebiede m/z 41–44, 55–57, 67–69... is tipies vir die massaspektra van alkanale en die ione hierbo genoem kan dus die molekulêre ione van heksanaal, heptanaal, oktanaal, nonanaal en dekanaal wees. K398 (T 5.3) kon as heksanaal geïdentifiseer word op grond van die aanwesigheid van ione by m/z 82 en 72 in MS 5.4, hoewel die molekulêre ioon in hierdie geval nie by m/z 100 in die betrokke spektrum aanwesig is nie.

Soortgelyke waarnemings en gevolgtrekkings het tot die identifikasie van K2419 (T 5.3; MS 5.9) en K2845 (T 5.3; MS 5.10) as undekanaal en dodekanaal onderskeidelik gelei, hoewel die molekulêre ione van hierdie verbindings ook nie in die betrokke spektra aanwesig is nie. Hierdie twee verbindings het ook met retensietydintervalle wat met die van die ander ooreenstem, geëlueer. Die ione met die hoogste massas wat in hierdie twee spektra voorkom, is dié by $[M-44]^+$.

Indien hierdie verbindings korrek as die onderskeie aldehyede geïdentifiseer is, sou daar verwag kon word dat daar 'n prominente ioon wat deur die volgende herrangskikking gevorm word by m/z 44 in die spektra aanwesig sou wees:

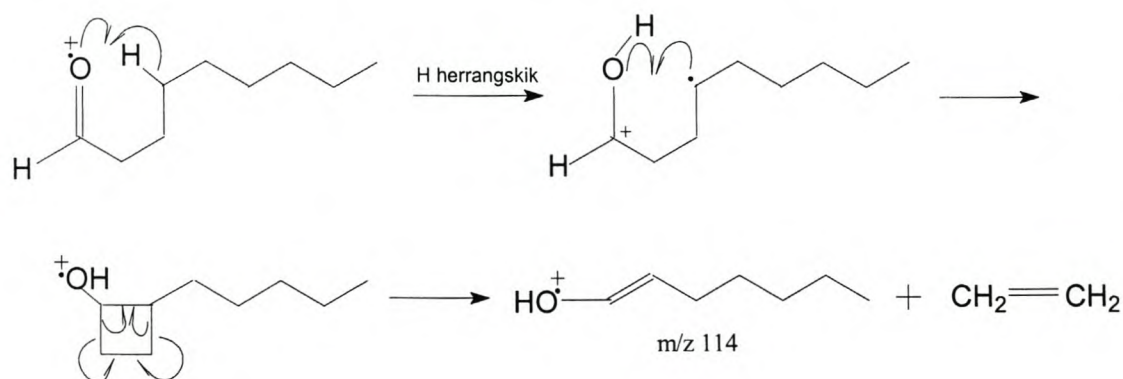


Hierdie m/z 44 ioon is wel in elk van die massaspektra van die onderskeie verbindings aanwesig, en is ook die basispiek by die verbinding wat as heptanaal (K1215, T 5.1) geïdentifiseer is. Dat hierdie herrangskikking in vyf van die sewe verbindings verantwoordelik is vir 'n ioon met 'n laer relatiewe intensiteit as die basispiek, kan toegeskryf word aan die feit dat onvertakte aldehyede met kettings van 4 tot 7 koolstowwe wel die McLafferty herrangskikking toon, terwyl aldehyede met 8 en meer koolstowwe die volgende herrangskikking- en fragmentasiestappe ondergaan om die $[\text{McLafferty} + 13]^+$ -ioon by m/z 57 te vorm, wat prominente pieke is in al vyf die gevalle, met m/z 57 as basispiek by die komponente wat as nonanaal (K2238, T 5.1) en dodekanaal (K2845, T 5.3) geïdentifiseer is. Die spektrum van nonanaal word hier as 'n voorbeeld bespreek^{1,3}:

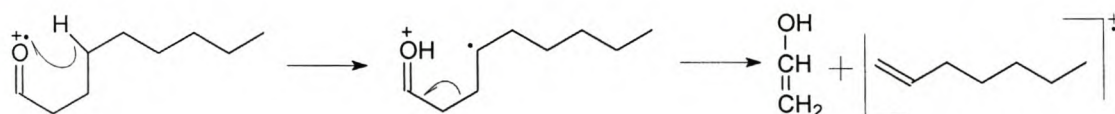


Die vorming van $[\text{C}_n\text{H}_{2n+1}\text{CO}]^+$ en $[\text{C}_n\text{H}_{2n+1}]^+$ in die massaspektra van aldehyede is verantwoordelik vir die aanwesigheid van ione by m/z 29, 43, 57, ens., wat tipies in hierdie spektra voorkom². Die fragmentasies wat tot hierdie ione aanleiding gee, verklaar ook waarom daar 'n ioon by m/z 57 aanwesig is in die gevalle van heksanaal (K398; T 5.3) en heptanaal wat nie 'n (McLafferty + 13)-fragmentasie kan ondergaan nie.

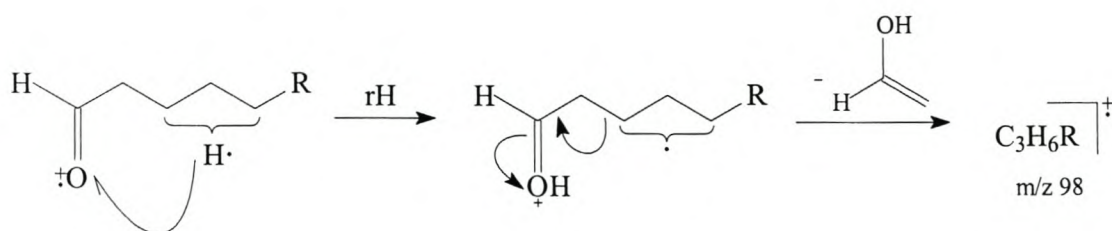
Die eliminasië van 'n etileenmolekuul, wat verantwoordelik is vir die vorming van die $[M - 28]^+$ -ioon, kan in die geval van nonanaal as volg verduidelik word^{1,37}:



Nog 'n kenmerk van aldehyede sonder α -vertakking, is die teenwoordigheid van 'n $[M - 44]^+$ -ioon, wat die basispiek is in die spektrum van die verbinding wat as heksanaal geïdentifiseer is. Eksperimente met ^{18}O -gemarkte aldehyede het getoon dat die m/z 44-ioon gevorm word deur die verlies van 'n fragment met die algemene formule C_nH_{2n} ⁴. Dit impliseer β -splitsing met waterstofoordrag soos in 'n McLafferty herrangskikking, maar met die behoud van die lading op die koolwaterstoffragment:

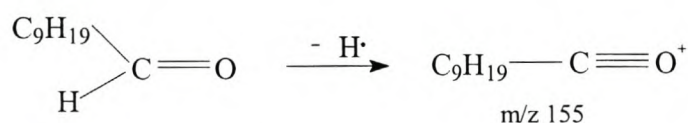
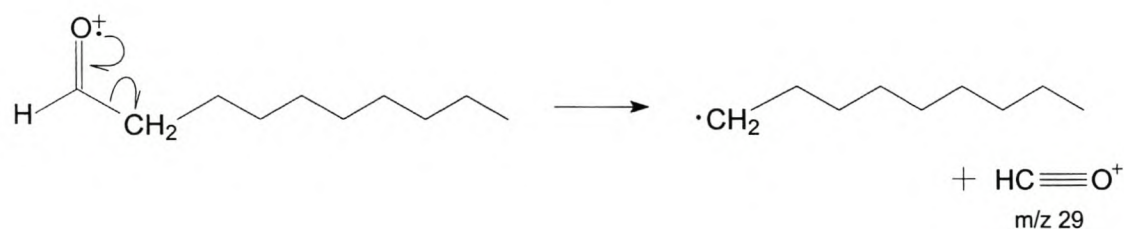


Inligting wat egter verkry is deur eksperimente met gedeutereerde heksanale uit te voer, demonstreer dat hierdie proses nie 'n posisie-spesifieke McLafferty-herrangskikking behels nie, maar dat oordrag van 'n waterstofatoom van die β -, γ - of δ -posisies vir 81% van die totale waterstofoordrag verantwoordelik is, en dat die volgende dus 'n meer realistiese voorstelling sou wees⁸:



Soos die koolstofkettinglengte van regruutketting alifatiese aldehiede toeneem, neem die invloed van die karbonielgroep op eenvoudige β -, γ -, δ -,... fragmentasies af, terwyl die koolwaterstofgedeelte se invloed op die massaspektrum toeneem. Opeenvolgende verliese van 28 massa-eenhede vanaf die $[M-44]^+$ -ioon waar slegs die koolwaterstofgedeeltes ter sprake is, illustreer hierdie verskynsel¹.

In aldehyede is daar twee moontlike posisies vir α -klowing, weerskante van die suurstofatoom, d.w.s. met die eliminasië van óf 'n heptielradikaal óf 'n waterstofatoom, met die lading wat op die suurstofbevattende fragment agterbly. Die verlies van die groter heptielradikaal vind by voorbaat plaas, wat bevestig word deur die relatiewe intensiteit van die ione by m/z 29 (30-60%) en $[M - 1]^+$ (<1% by elk). Die vorming van hierdie ione kan in die geval van dekanaal (K2025, T 5.2) soos volg geformuleer word:



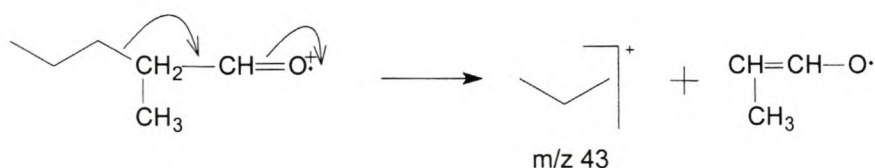
Die ioon by m/z 43 kan ook 'n suurstofbevattende fragment met die formule $C_2H_3O^+$ wees. Die betrokke fragmentasie is verantwoordelik vir prominente ione in die spektra van al vier die aldehyede, en vir die vorming van die basispieke in die spektra van oktanaal (K1094, T 5.2), dekanaal en undekanaal (K2419, T 5.3). Hierdie ione word gevorm deur die verlies van 'n waterstofatoom uit die m/z 44 ione⁵.

In die hoër massagebiede van die spektra kom pieke by $[M - 33]^+$ voor wat toegeskryf kan word aan die verlies van water uit die molekulêre ioon, gevolg deur die verlies van 'n metielradikaal⁶. Deuteriummerkingseksperimente het getoon dat die primêre posisie vir waterstofatoomoordrag met die eliminasië van water, die C-3 koolstofatoom is. Die presiese meganisme vir hierdie verlies van die metielradikaal is nog onbekend, maar daar is gevind dat die waterstofatome van die radikale nie 'n spesifieke oorsprong het nie⁷.

Die vorming van die $[M - 46]^+$ -ione kan gerasionaliseer word as die opeenvolgende verliese van 'n etileenmolekuul en water uit die molekulêre ioon. Die ione by $[M-72]^+$, $[M-100]^+$, $[M-128]^+$, en daaropvolgende ione wat 28 massa-eenhede uitmekaar voorkom, kan toegeskryf word aan verdere fragmentering van die koolwaterstofkettings in die verbindings, omdat die koolwaterstofkettings van onvertakte aldehyede 'n toenemende rol speel in die massaspektra van die betrokke aldehyede namate die molekulêre massas toeneem¹.

5.2 Aldehyede: Vertak

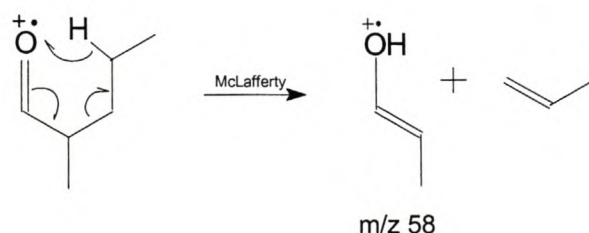
Die EI-massaspektrum van K581 (T 5.1, MS 5.11) het 'n basispiek by m/z 43. Deur die betrokke massaspektrum te vergelyk met spektra in die NBS¹⁹ biblioteek, is vasgestel dat die molekuul moontlik 2-metielpentanaal kan wees. Die vorming van 'n ioon by m/z 43 kan toegeskryf word aan 'n β -klowing met lokalisering van die lading op die alkeenfragment¹.



Die aanwesigheid van die reeks ione by m/z 29, 43, 57, 71 kan toegeskryf word aan die vorming van beide $C_nH_{2n+1}CO^+$ - en $C_nH_{2n+1}^+$ -ione².

Waar eenvoudige β -klowing verantwoordelik is vir die ioon by m/z 57, bevat die massaspektrum van hierdie β -vertakte molekule nie 'n ioon by m/z 85, wat sou dui op die $(M-15)^+$ -ioon of 'n verlies van 'n metielgroep, nie. Die rede daarvoor is dat β -klowing byna uitsluitlik met die verlies van die groter alkielfragment plaasvind²³.

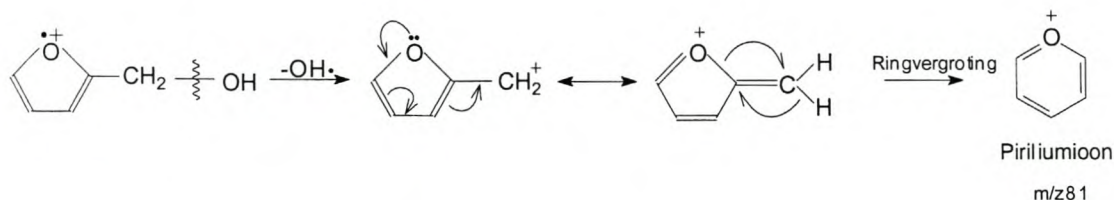
Aangesien daar 'n γ -waterstof in hierdie verbinding teenwoordig is, bevat die spektrum soos verwag kon word 'n ioon by m/z 58 wat deur 'n McLafferty-herrangskikking soos volg gevorm word²²:



5.3 Alkohole: Furfurielalkohol (2-Furaanmetanol)

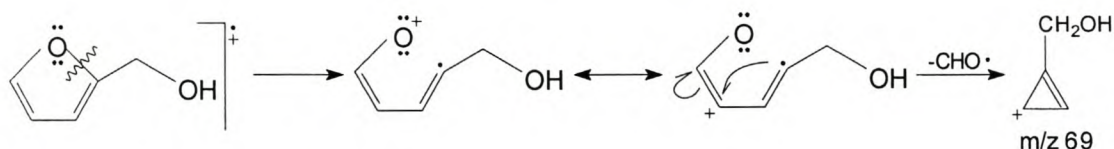
Soos by die meeste furane is daar 'n baie sterk (87%) molekulêre ioon by m/z 98 in die massaspektrum van K576 (T 5.3; MS 5.12) aanwesig. Hierdie spektrum het 'n basispiek by m/z 41 terwyl 'n verlies van 'n waterstofradikaal die $[M-1]^+$ -ioon by m/z 97 lewer.

β -Kloring is verantwoordelik vir die vorming van die ion by m/z 81. Die dryfkrag vir hierdie fragmentasiereaksie is die vorming van die aromatiese piriliumioon, wat gestabiliseer word deur ringvergrooting en resonansie⁸:



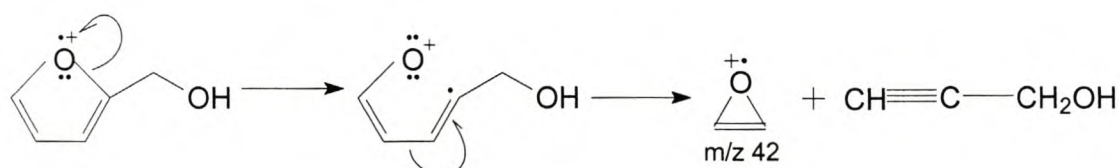
Die ion by m/z 70 word gevorm deur die eliminerings van koolstofmonoksied (CO). Hierdie feit kan gestaaf word deurdat 'n metastabiele piek wat met hierdie reaksie gepaard gaan waargeneem is in 'n massaspektrum wat met 'n sektorinstrument met Nier-Johnson geometrie opgeneem is⁹.

'n Proses wat deur fragmentasie van die furaankern geïnisieer word, is verantwoordelik vir die vorming van die ion by m/z 69, soos volg:

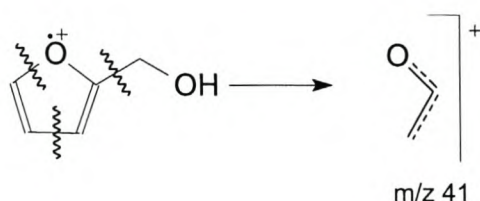


β -Eliminasie van die hidroksielgroep, gevolg deur CO-eliminatie lei tot die vorming van die ion by m/z 53 (C_4H_5)⁺.

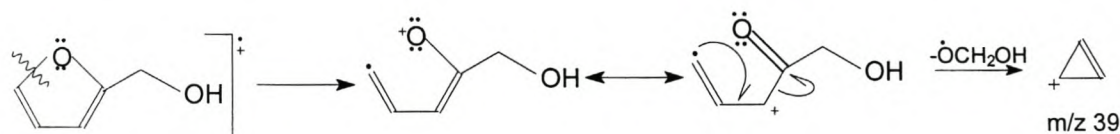
Budzikiewicz, Djerassi en Williams rasionaliseer vorming van die ion by m/z 42 in die massaspektrum van hierdie verbinding soos volg¹⁰:



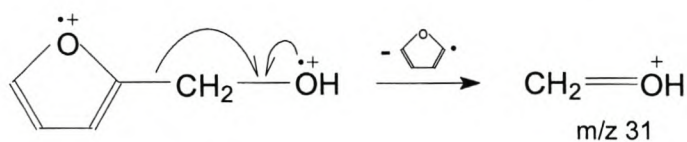
Minstens twee moontlikhede bestaan vir die vorming van die basispiek by m/z 41. Dit kan moontlik vorm deur die verlies van 'n waterstofradikaal uit die ioon by m/z 42, of dit is 'n C_2HO^+ -ioon wat soos volg deur 'n eenvoudige fragmentasie ontstaan¹¹:



Fragmentasie van heteroatomiese verbindings gaan dikwels gepaard met die eliminasië van die heteroatoom in 'n neutrale fragment of verbinding¹². Die aanwesigheid van 'n ioon by m/z 39 in hierdie spektrum kan dus soos volg gerasionaliseer word⁸:



Die ioon by m/z 31, waarskynlik $(CH_2OH)^+$, kan deur α -klowing gevorm word. Alhoewel die piek met 'n relatief lae intensiteit (31%) in die spektrum aanwesig is en nie veel diagnostiese bydrae lewer nie, kan die redelik eenvoudige meganisme waardeur dit gevorm word soos volg geformuleer word:

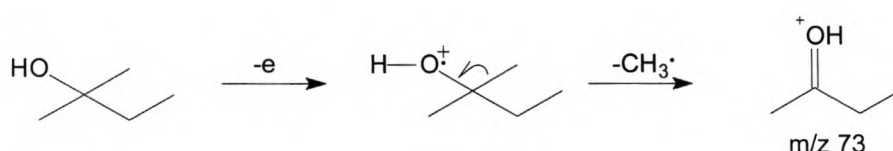


'n Formielkation ($HC \equiv O^+$) kan gevorm word deur fragmentasie van die molekulêre ioon, wat die ioon by m/z 29 tot gevolg het¹³.

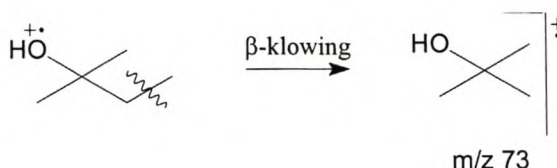
5.4 Alkohole: 2-Metiel-2-butanol

Die massaspektrum van K307 (T 5.1; MS 5.13) het 'n basispiek by m/z 59. Die verbinding is as 2-metiel-2-butanol geïdentifiseer. Die vorming van die basispiek kan gerasionaliseer word in terme van 'n α -klowing van die langer koolstofketting. Hierdie verskynsel word veral by 2° en 3° alkohole waargeneem. Fragmentasie vind plaas om die substituent met die grootste massa te elimineer²⁴. Dit gebeur omdat die enkel elektron van die neutrale radikaal meer gereedlik in langer kettings of deur verdere fragmentasie gestabiliseer kan word²⁵.

Nog 'n prominente ioon kom by m/z 73 in die spektrum voor. α -Klowing is ook vir die vorming van hierdie ioon verantwoordelik met die vorming van die stabiele oksoniumioon as die dryfkrag agter hierdie reaksie. Die energie wat hierdeur gewen word, is genoegsaam om te kompenseer vir die energie wat vir die fragmentasiereaksie benodig word²⁶.



Hierdie ioon by m/z 73 kan ook gevorm word deur middel van 'n gewone β -klowingsreaksie²⁷:

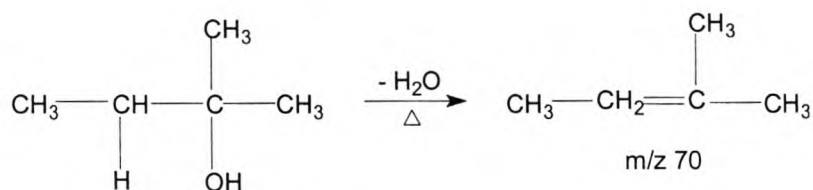


Die molekulêre ioon by m/z 88 is nie sigbaar in hierdie spektrum nie. By 3° alkohole word die splyting langs die katernêre koolstof tot so 'n mate bevoordeel dat die molekulêre ioon nie waargeneem kan word nie²⁸. Die vervanging van 'n waterstofatoom van alkane met 'n hidroksielgroep verlaag die ionisasie energie, maar, ten spyte van hierdie stabilisering, word die stabiliteit van die molekulêre ioon tot so 'n mate oorskadu deur fragmentasie wat met die geïoniseerde hidroksielgroep geassosieer is, dat die intensiteit van die molekulêre ioon dramaties verlaag word³².

Die ioon by m/z 55 word gevorm deur die verlies van 'n fragment met 'n massa van 33 massaeenhede, wat kenmerkend is vir alkohole²⁹. Geen verklaring vir die vorming van hierdie ioon kon in die literatuur opgespoor word nie.

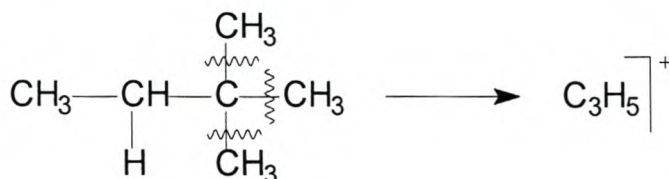
Die relatief prominente ioon by m/z 43 en die ioon by m/z 29 is onderskeidelik $(C_2H_3O)^+$ en $(CHO)^+$ wat deur die verlies van die alkielsubstituente van die katernêre koolstofatoom gevorm word³⁰.

Termiese en katalitiese dehidrering kan die $[M-18]^+$ -ioon lewer. Alhoewel hierdie fragmentasie ook deur elektronimpakionisasie sou kon plaasvind, het die aanwesigheid van die betrokke metastabiele piek in spektra wat met 'n sektorinstrument opgeneem is, bewys dat hierdie ioon deur die eersgenoemde prosesse gevorm word. Verwarmde inlaatsisteme in die massaspektrometer of warm metaaloppervlaktes van die ioonbron kan so 'n 1,2-eliminering van H_2O tot gevolg hê voordat ionisasie plaasvind³¹:



'n Ander ioon wat redelik prominent is in die massaspektrum van 2-metiel-2-butanol, is dié by m/z 41. Geen meganisme vir die vorming van hierdie ioon kon in die literatuur gevind word nie, maar die rede vir die ioon se teenwoordigheid is die ontstaan van 'n

$C_3H_5^+$ -ioon, en 'n moontlike verduideliking vir die vorming daarvan kan die agtereenvolgende verliese van die drie substituentte wees, soos hieronder skematies geïllustreer³⁰:

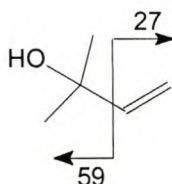


Die gelyktydige verlies van H_2O en etileen, $[\text{M}-46]^+$, ook 'n kenmerkende verlies by alkohole²⁹, lewer die ioon by m/z 42³³. Die $[\text{M}-28]^+$ -ioon by m/z 60 dui op 'n verlies van etileen vanaf die molekulêre ioon en die ioon by m/z 71 kan toegeskryf word aan 'n $C_5H_{11}^+$ -ioon, gevorm deur die verlies van die hidroksielgroep³⁰.

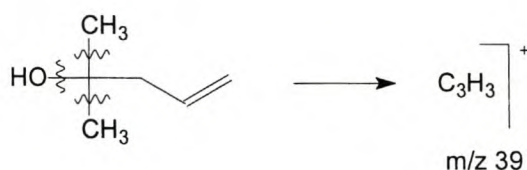
5.5 Alkohole: 2-Metiel-3-buten-2-ol

Die massaspektrum van K258 (T 5.1; MS 5.14) het 'n basispiek by m/z 71 en die verbinding is geïdentifiseer as 2-metiel-3-buten-2-ol met behulp van vergelyking van die verbinding se massaspektrum met dié in die NBS en NIST biblioteke^{19,20}.

Die ioon by m/z 71 word gevorm deur die verlies van 'n metielradikaal uit die molekulêre ioon³⁴. α -Splitsing met die verlies van die grootste substituent is verantwoordelik vir die vorming van die ioon by m/z 59³⁵. Indien die lading op die koolwaterstoffragment sou bly, is α -splitsing op dieselfde posisie verantwoordelik vir die ioon by m/z 27:



Die vorming van $(\text{CH}_3\text{CO})^+$ - en $(\text{C}_3\text{H}_7)^+$ -ione in die spektra van sekere alkohole kan, volgens Budzikiewicz *et al.*³⁶, tot die aanwesigheid van 'n prominente ioon by m/z 43 bydra, maar as gevolg van die struktuur van 2-metiel-3-buten-2-ol is dit onwaarskynlik dat laasgenoemde ioon gevorm kan word. Die ioon by m/z 43 is in hierdie spektrum dus waarskynlik uitsluitlik $(\text{CH}_3\text{CO})^+$ en die ioon by m/z 41 waarskynlik $(\text{C}_3\text{H}_5)^+$. Die ioon by m/z 39 word waarskynlik deur die verlies van die hidroksielgroep en twee metielgroepe volgens 'n onbekende meganisme gevorm:

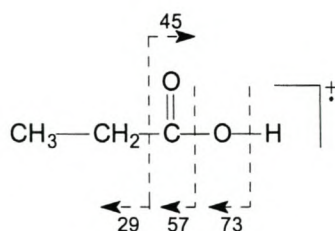


Die molekulêre ioon, by m/z 86, is nie in hierdie spektrum sigbaar nie, maar wel die $[\text{M}-1]^+$ -ioon by m/z 85, as gevolg van α -klowing³⁶. 'n Verlies van water lei tot die vorming van die $[\text{M}-18]^+$ -ioon, by m/z 68.

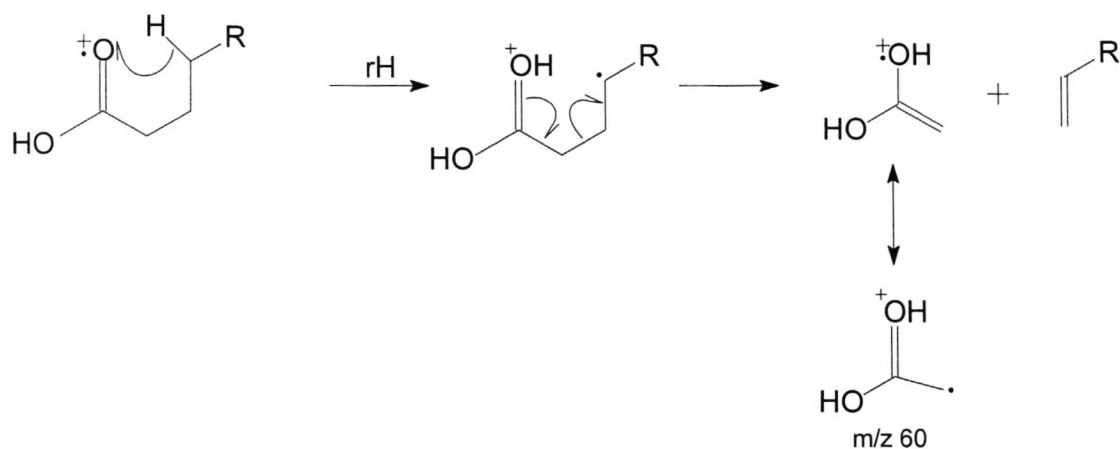
Die gelyktydige verlies van 'n watermolekuul en 'n metielgroep lei tot die vorming van die ioon by m/z 53 en die verlies van die hidroksielgroep tot die vorming van die ioon by m/z 69.

5.6 Karboksielsure: Versadig

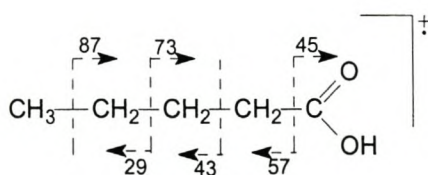
Die EI-massaspektrum van K298 (T 5.3; MS 5.15) het twee prominente ione by m/z 74 en 73. Hierdie ione is kenmerkend van propanoësuur en verteenwoordig die molekulêre ioon en die $[\text{M}-1]^+$ ioon onderskeidelik¹⁴. Laasgenoemde word gevorm deur die eliminasië van die karboksielsuur-proton. Die ioon by m/z 57 kan toegeskryf word aan die verlies van 'n hidroksielgroep deur α -klowing. Hierdie en ander eenvoudige fragmentasiereaksies wat die molekulêre ioon kan ondergaan, kan skematies soos volg voorgestel word:



Die EI-massaspektra van K703 (T 5.2; MS 5.16), K1033 (MS 5.17), K1442 (MS 5.18), K1876 (MS 5.19), K2293 (MS 5.20), K2695 (MS 5.21), K3086 (MS 5.22), K3464 (MS 5.23), K3825 (MS 5.24), K4182 (MS 5.25), K4520 (MS 5.26), K4856 (MS 5.27) en K5142 (MS 5.28) in die TIC in Figuur 5.3, word gekarakteriseer deur die teenwoordigheid van 'n prominente ioon by m/z 60, wat aandui dat al hierdie komponente alifatiese sure is¹⁵. Hierdie ioon word gevorm deur die gewone McLafferty herrangskikking van 'n onvertakte karboksiesuur¹⁷:



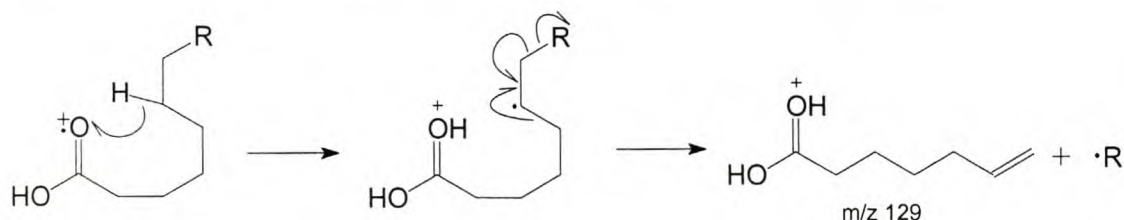
Indien K703 pentanoësuur is, kan die vorming van ander ione in die spektrum as volg deur middel van α -, β -, γ - en δ -klowings verklaar word:



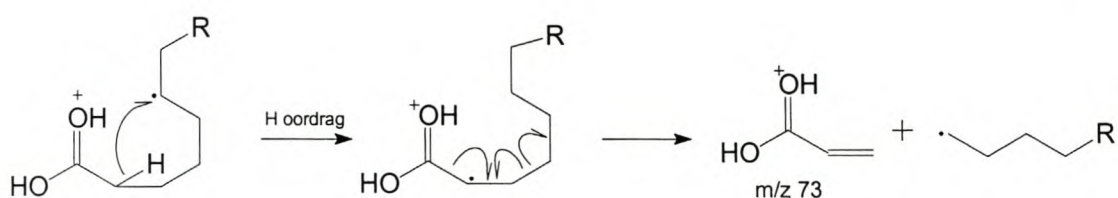
Geen verduideliking is tot dusver in die literatuur beskikbaar in verband met die teenwoordigheid van die prominente ion by m/z 41 in die spektrum van pentanoësuur nie. Hoë resolusie massaspektrometrie het egter getoon dat die elementêre samestelling van hierdie fragment wel C_3H_5 is, en dat dit waarskynlik kan vorm deur verdere ontbinding van die m/z 60 ion¹⁴.

Op grond van hul retensietye en massaspektra, is afgelei dat die verbindings K1033 tot K5142 waarskynlik tot dieselfde homoloë reeks behoort. Die EI-massaspektrum van K4182 sal as verteenwoordigend van hierdie langketting homoloë reeks bespreek word. Sure het oor die algemeen relatief prominente molekulêre ione, waarvan die relatiewe intensiteit met molekulêre massa vir onvertakte alifatiese karboksiesure wat meer as ses koolstowwe bevat, toeneem¹⁶. In die geval van K1039, K1440, K1876, K2294, K2694, K3088, K3466 en K3827 kan die molekulêre ione egter nie waargeneem word nie, selfs nie as enkelioonchromatogramme van die betrokke molekulêre ione gekonstrueer word nie. Dit is moontlik toe te skryf aan die klein hoeveelhede van hierdie verbindings wat in die ekstrakt teenwoordig is. Molekulêre ione is daarenteen wel by K4182, K4520, K4856 en K5142 sigbaar. Die ion by m/z 228 in die massaspektrum van K4182 is aanvaar as die molekulêre ion van hierdie verbinding en hierdie komponent is dus as tetradekanoësuur ($C_{14}H_{28}O_2$, 228 Da) geïdentifiseer.

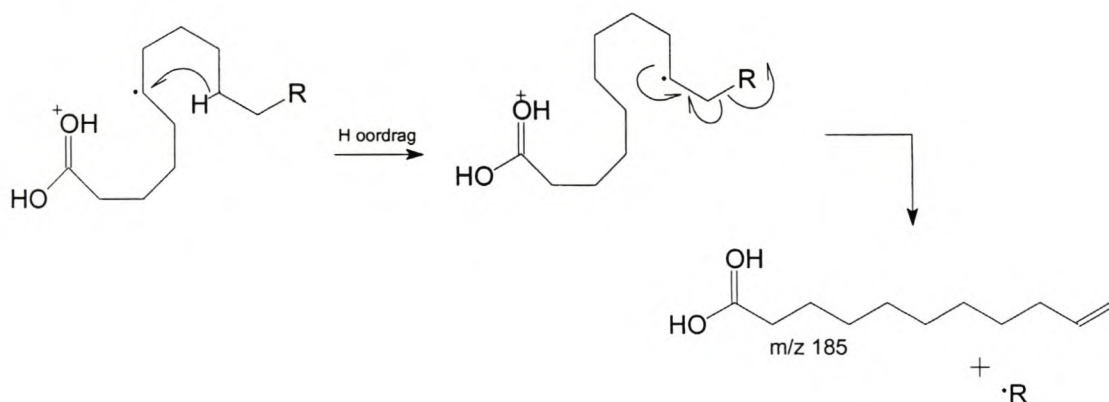
'n Prominente reeks ione in hierdie massaspektrum kom voor by m/z 73, 115, 129, 143, 157... . Hierdie ione word gevorm deur waterstofoordrag vanaf koolstofatome in die koolstofketting van die karboksiesuur, wat gepaard gaan met die homolise van een van die bindings in 'n β -posisie ten opsigte van koolstof wat die waterstof afgee. In die geval van die m/z 129 ion, byvoorbeeld, kan die proses as volg geformuleer word:



Van die moontlike reaksies wat vir die vorming van hierdie reeks ione verantwoordelik is, is die een wat die vorming van die m/z 73 ioon tot gevolg het klaarblyklik die een wat by voorkeur plaasvind. Dit geskied deur die oordrag van 'n waterstofatoom vanaf die α -posisie relatief tot die karbonielgroep, gevolg deur β -klowing. Die dryfkrag vir hierdie reaksie is die hoë stabiliteit van die α,β -onversadigde geprotoneerde karbonielsisteem. Hierdie [McLafferty+13]⁺-ioon gaan dikwels gepaard met die vorming van die normale McLafferty herrangskikkingsioon³ en die ontstaan daarvan kan as volg verduidelik word:

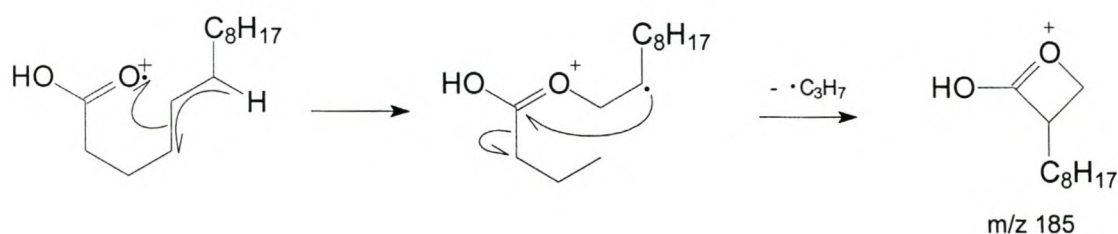


Op dieselfde wyse, met waterstofmigrasie vanaf C10, gevolg deur β -klowing, word die ioon by m/z 185 gevorm:

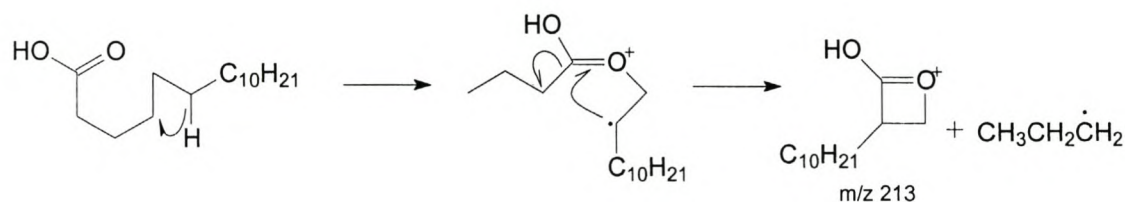


Die aanwesigheid in die spektrum van die ioon by m/z 185 stem ook ooreen met die verlies van 43 atoommassaeenhede vanaf die molekulêre ioon, en kan verduidelik word in terme van 'n herrangskikkingsreaksie wat die oordrag van 'n waterstofatoom vanaf C6

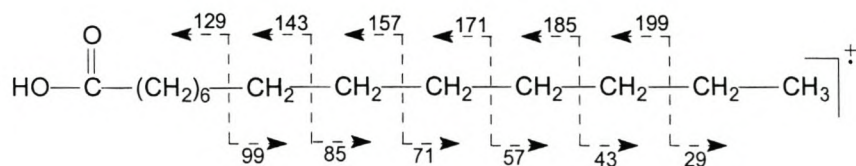
behels, en die eliminerings van die fragment wat koolstofatome C2 – C4 bevat, tot gevolg het:



Die ioon by m/z 213 wat slegs by die laaste drie komponente in die reeks, d.w.s. dié met die grootste molekulêre massas, voorkom, kan aan die hand van die volgende reaksies verduidelik word:



Die ontstaan van die reeks ione by m/z 199 $[M-29]^+$, 185 $[M-43]^+$, 171 $[M-57]^+$, 157 $[M-71]^+$, ens. kan ook verduidelik word in terme van eenvoudige α -klouwing met die lading wat op die suurstofbevattende fragmente behoue bly. α -Klouwing met die behoud van lading op die alkielgroep is verantwoordelik vir die ione by m/z 29, 43, 57, ens. in die spektrum:



Indien die bostaande aannames korrek is, kan aanvaar word dat die bogenoemde komponente, K703, K1033, K1442, K1876, K2293, K2695, K3086, K3464, K3825, K4182, K4520, K4856 en K5142 onderskeidelik pentanoësuur, heksanoësuur, heptanoësuur, oktanoësuur, nonanoësuur, dekanoeësuur, undekanoësuur, dodekanoësuur, tridekanoësuur, tetradekanoësuur, pentadekanoësuur, heksadekanoësuur en heptadekanoësuur is.

K4050 (T 5.3; MS 5.29) toon 'n basispiek by m/z 43 asook ione by m/z 185, 143, 129, 87, 73, 60, ens. wat kenmerkend is van versadigde alifatiese karboksielsure. As daar aangeneem word dat die ioon met die hoogste massa wat in die spektrum aanwesig is, die $[M-43]^+$ -ioon is, kan gespekuleer word dat hierdie 'n isomeer van tetradekanoësuur is. Dit is nie altyd moontlik om vanaf die massaspektra van veral langkettingsure af te lei of die sure vertak of onvertak is nie¹⁸, en waar die vertakking aangetref word nie, veral nie wanneer die vertakking in die omgewing van die metielterminale punt van die suur voorkom nie. Die argument dat hierdie komponent moontlik 'n vertakte tetradekanoësuur-isomeer is, kan egter gestaaf word deur die feit dat die retensietyd van 'n vertakte karboksielsuur op 'n kolom met lae polariteit, soos in hierdie geval gebruik, korter is as dié van die onvertakte analoog. Die komponent wat as tridekanoësuur geïdentifiseer is elueer by ca. 3827 sekondes, die komponent wat as tetradekanoësuur geïdentifiseer is by ca. 4190 sekondes en hierdie verbinding by ca. 4050 sekondes. Laasgenoemde verbinding is dus as 'n tetradekanoësuur geïdentifiseer. Die presiese struktuur sal egter met behulp van retensietydvergeliking met vertakte C14-sure bepaal moet word.

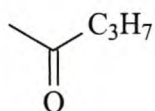
5.7 Karboksielsure: Onversadig

Die EI-massaspektrum van K4772 (T 5.3; MS 5.30) het 'n basispiek by m/z 55, wat 'n ioon is in die reeks 41, 55, 69, 83, 97, ens. Hierdie ione stem ooreen met die algemene formule $[C_nH_{2n-1}]^+$, wat algemeen voorkom in die massaspektra van onversadigde alifatiese sure. Die komponent het 'n retensietyd wat ongeveer 111 sekondes korter is as dié van heksadekanoësuur, K4882, wat daarop kan dui dat die verbinding 'n

heksadekenoësuur kan wees en die ioon by m/z 236 kan dus deur die verlies van 'n molekule water uit die molekulêre ioon gevorm word. 'n Rekenaarsoektog wat in die massaspektrumbiblioteke, NBS, NIST en Wiley, uitgevoer is, het 9-heksadekenoësuur as 'n sterk moontlikheid aangedui^{19,20,21}. Die identifisering is bevestig deur retensietydvergelyking met gesintetiseerde (*Z*)-9-heksadekenoësuur. Hierdie verbinding kom algemeen in biologiese materiaal van dierlike oorsprong voor.

5.8 Metielbutanoon

Die EI-massaspektrum van K340 (T 5.1; MS 5.31) het prominente ione by m/z 43 (basispiek) en m/z 86 (molekulêre ioon). Daar is gevind dat m/z 43, $[\text{CH}_3\text{CO}]^+$, die basispiek in die massaspektra van verskeie metielketone is³⁸. Aangesien die molekulêre ioon van ketone gewoonlik sigbaar is³⁹, is K340 as 'n metielketoon aanvaar met $\text{C}_5\text{H}_{10}\text{O}$ as molekulêre formule:

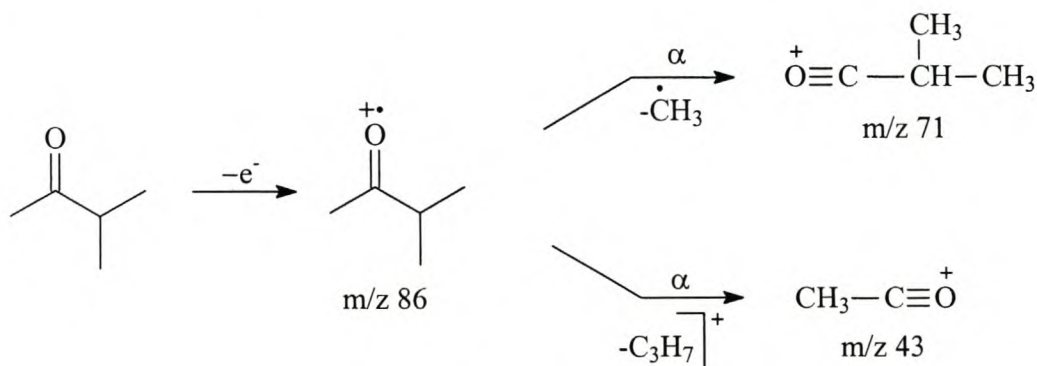


Wanneer 'n ketting van drie of meer koolstofatome aan die karbonielgroep gebind is, word die McLafferty herrangskikking (β -klowing wat gepaard gaan met die oordrag van 'n γ -waterstofatoom) 'n belangrike faktor in die massaspektrum van 'n verbinding⁴⁰. In die geval van ketone is die situasie egter minder eenvoudig vir die volgende twee redes:

- Selfs by onvertakte ketone sal die massa van die herrangskikkingsioon varieer na gelang van die alkielgroep wat nie by die herrangskikking betrokke is nie. Onvertakte metielketone, of metielketone wat op 'n posisie verder as die derde koolstof vanaf die karbonielgroep vertak is, sal die herrangskikkingsioon by m/z 58 gee. Etil- en propiel- of isopropielketone met die bogenoemde vertakkingseienskappe gee onderskeidelik die ione by m/z 72 en m/z 86.
- Wanneer 'n koolstofketting van drie of meer atome in beide alkielgroepe weerskante van die karbonielgroep voorkom, bestaan die moontlikheid vir

'n tweede McLafferty herrangskikking as gevolg van die enolproduk van die primêre herrangskikking wat weer kan fragmenteer deur die vorming van 'n sesledige oorgangstruktuur en 'n m/z 58 ioon tot gevolg het.

As die bogenoemde oorweeg word, is dit duidelik dat K340 'n vertakte ketoon moet wees, as gevolg van die afwesigheid van 'n herangskikkingsioon by m/z 58. Die enigste moontlikheid wat aan hierdie vereistes voldoen, is metielbutanoon. Die struktuur is bevestig deur middel van ko-eluering van die kommersieel-beskikbare verbinding met die natuurlike ekstrak. Die vorming van die ione by m/z 43, 71 en 86 in die massaspektrum kan as volg verduidelik word:

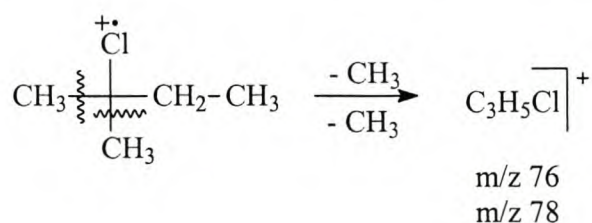


5.9 2-Chloro-2-metielbutaan

Die EI-massaspektrum van K366 (T 5.1; MS 5.32) het 'n basispiek by m/z 41. Die teenwoordigheid van sekere ione twee massa-eenhede uitmekaar, in 'n intensiteitsverhouding van 3:1, met die meer intense ioon by die laer m/z -waarde, is 'n aanduiding dat die verbinding moontlik 'n chlooratoom kan bevat aangesien die twee stabiele isotope van chloor, naamlik ^{35}Cl en ^{37}Cl , in hierdie verhouding in die natuur voorkom. Ander ione in die spektrum bevat ook chloor, byvoorbeeld dié by m/z 76:78 (63.0%:24.8%), m/z 77:79 (100%:33.3%), m/z 91:93 (20.7%:7.3%) en m/z 106:108 (0.3%:0.1%).

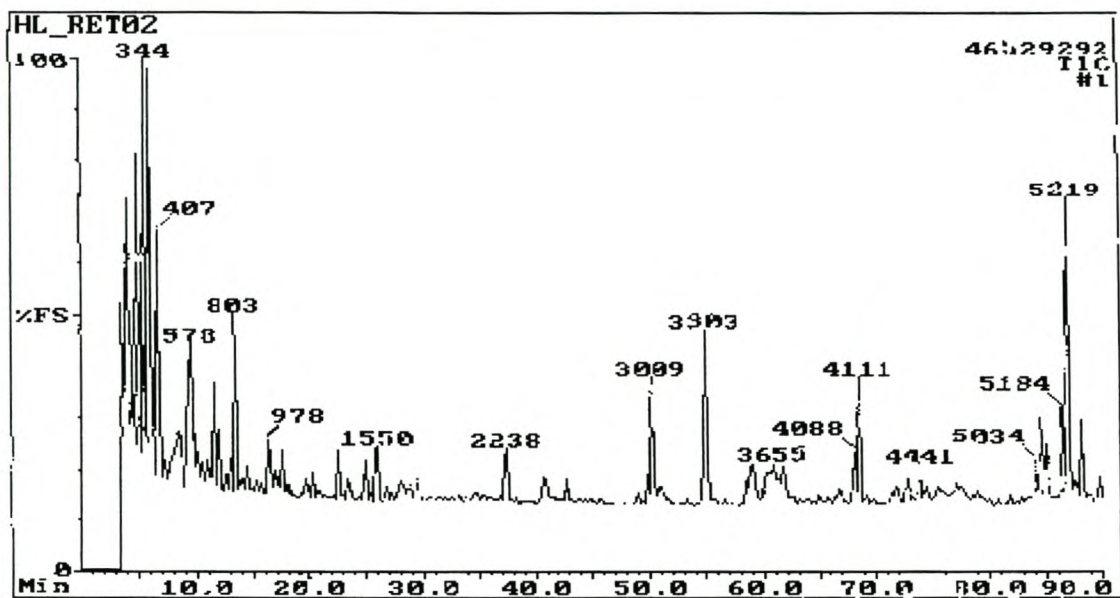
In die geval van chloriede vind die verlies van 'n soutsuurmolekule (HCl) meer geredelik plaas as die afspleting van slegs die halogeenatoom, wat die ioon by m/z 36 vorm. As gevolg van die hoë elektronegatiwiteit van halogeenatome, sal die positiewe lading, na afspleting van die halogeenatoom, op die koolwaterstoffragment behoue bly. Dit verduidelik die afwesigheid van 'n ioon by m/z 35. Hoewel die verlies van 'n chlooratoom en die verlies van HCl in laer sekondêre chloriede ($\leq C_6$) met vergelykbare waarskynlikheid plaasvind, word die verlies van slegs 'n chlooratoom by tersiêre chloriede gewoonlik bevoordeel, as gevolg van die vorming van 'n stabiele karbokatioon⁴¹. As aanvaar word dat die ioon by m/z 106 die molekulêre ioon is, is die ione by m/z 70 en 71 onderskeidelik $[M-HCl]^+$ en $[M-Cl]^+$, wat daarop dui dat hierdie 'n tersiêre chloried met die molekulêre formule $C_5H_{11}Cl$ is. Die verlies van 'n chlooratoom het gewoonlik ione met 'n hoë intensiteit ($>40\%$) tot gevolg⁴¹. Die ioon by m/z 91 kan deur die verlies van 'n metielgroep uit die molekulêre ioon gevorm word, met die ^{37}Cl -isotoopioon by m/z 93. Die verlies van 'n etielgroep deur middel van α -klowing uit die molekulêre ioon lewer die basispiek by m/z 77, met die ^{37}Cl -isotoop by m/z 79. Die vorming van hierdie $(CH_3)_2C=Cl^+$ -ioon is veral belangrik in die geval van tersiêre chloriede⁴².

Daar is reeds hierbo genoem dat daar afgelei kan word dat hierdie verbinding hoogs waarskynlik 'n tersiêre chloried is, as die hoë intensiteit van die $[M-Cl]^+$ -ioon teenoor die lae intensiteit van die $[M-HCl]^+$ -ioon in aanmerking geneem word. Die enigste moontlike struktuur wat vir hierdie verbinding voorgestel kan word, is dus 2-chloro-2-metielbutaan. Hieruit kan afgelei word dat die ioon by m/z 76, $[M-30]^+$, moontlik kan ontstaan deur die agtereenvolgende verlies van beide metielgroepe. Hierdie ioon bevat ook 'n chlooratoom, en dus dui die m/z 78 ioon op die ^{37}Cl -isotoop, soos hieronder skematies aangedui is:

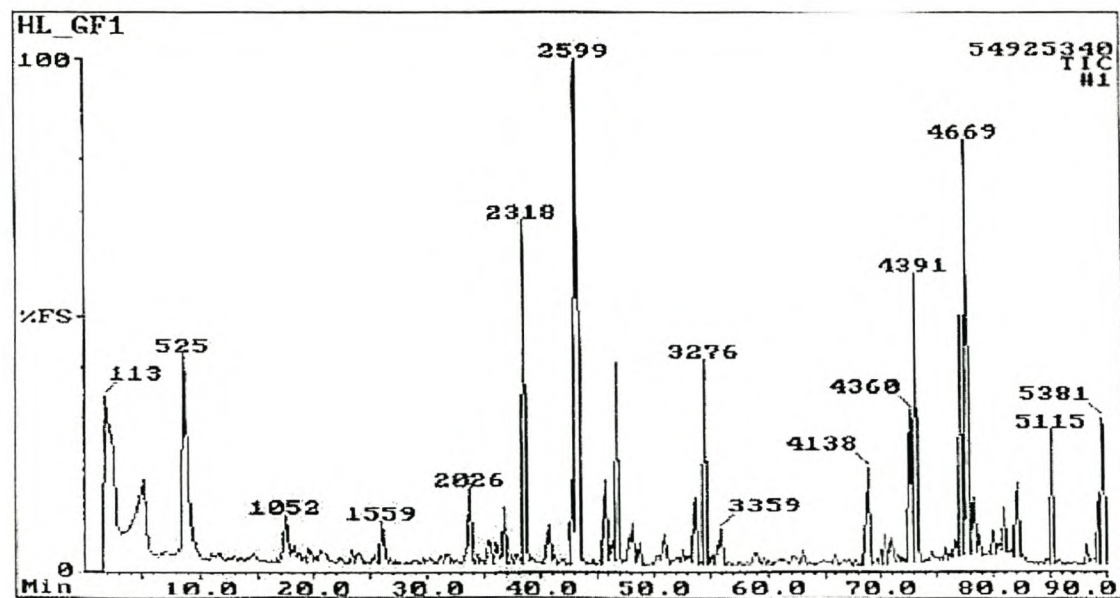


Die res van die massaspektrum word hoofsaaklik oorheers deur koolwaterstoffragmente. Die ioon by m/z 29 dui op die aanwesigheid van 'n etielgroep in die verbinding wat deur middel van α -klowing met die lading wat op die alkielfragment behoue bly, gevorm word. Agtereenvolgende verliese van die chlooratoom en twee metielgroepe kan die m/z 41 ioon, $[M-65]^+$, lewer, terwyl die ioon by m/z 55 toegeskryf kan word aan die vorming van 'n $(C_4H_7^+)$ -ioon⁴¹. Die identiteit van hierdie verbinding is deur middel van ko-eluering van die natuurlike verbinding en sintetiese 2-chloro-2-metielbutaan bevestig.

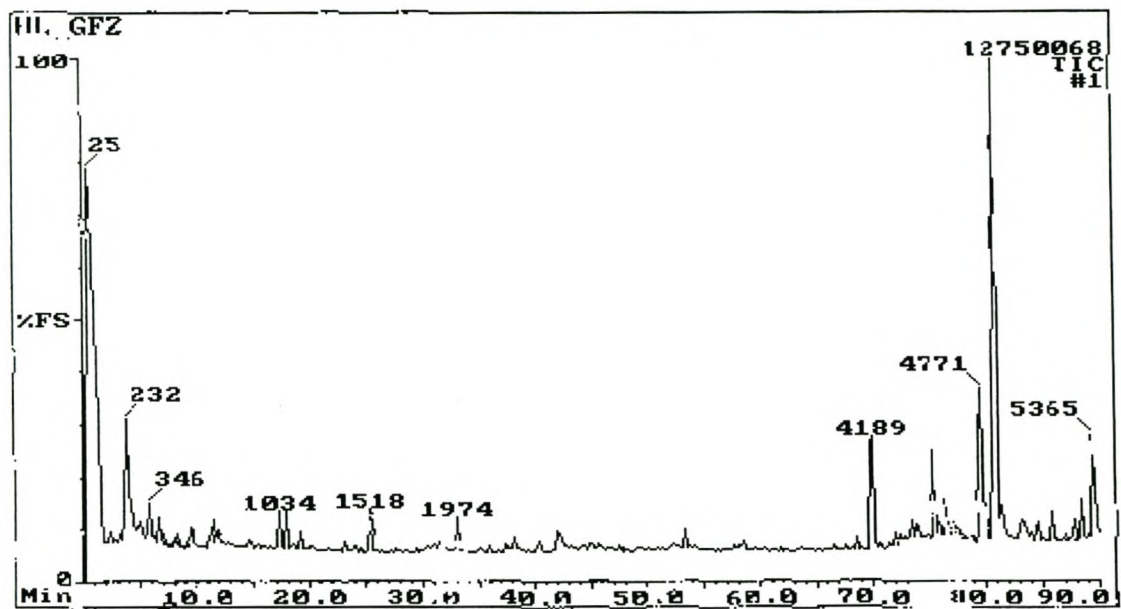
Figure: Hoofstuk 5



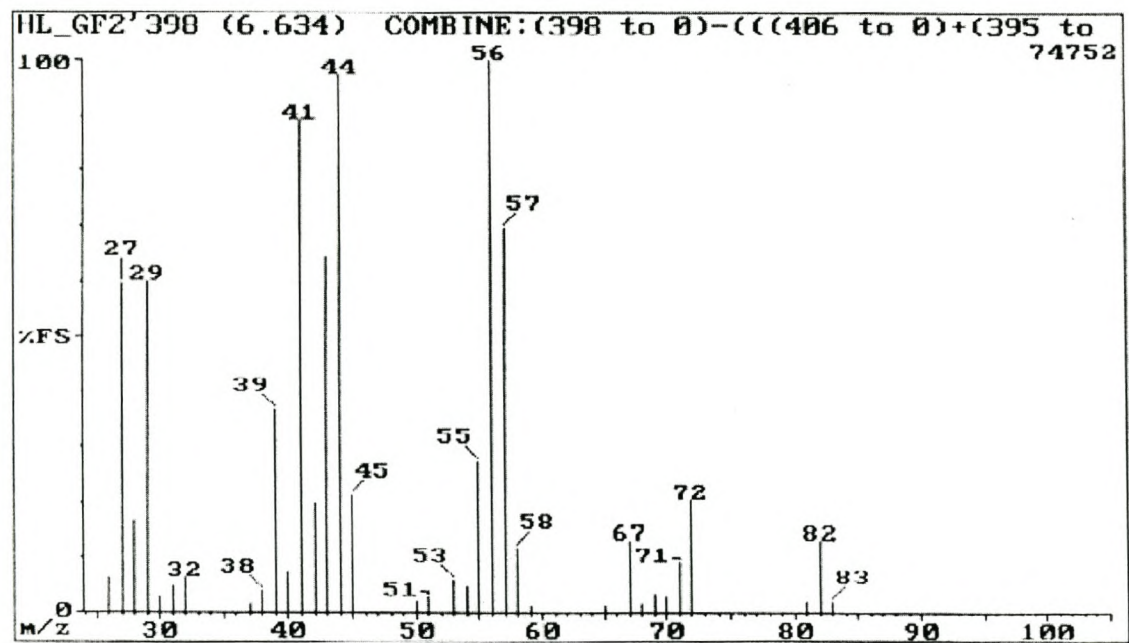
Figuur 5.1 TIC van die gekonsentreerde ekstrak van die afskeiding van volgesuigde *Haemaphysalis leachi* wyfies wat deur middel van normale monsterinspuiting sonder inlaatstroomverdeling verkry is.



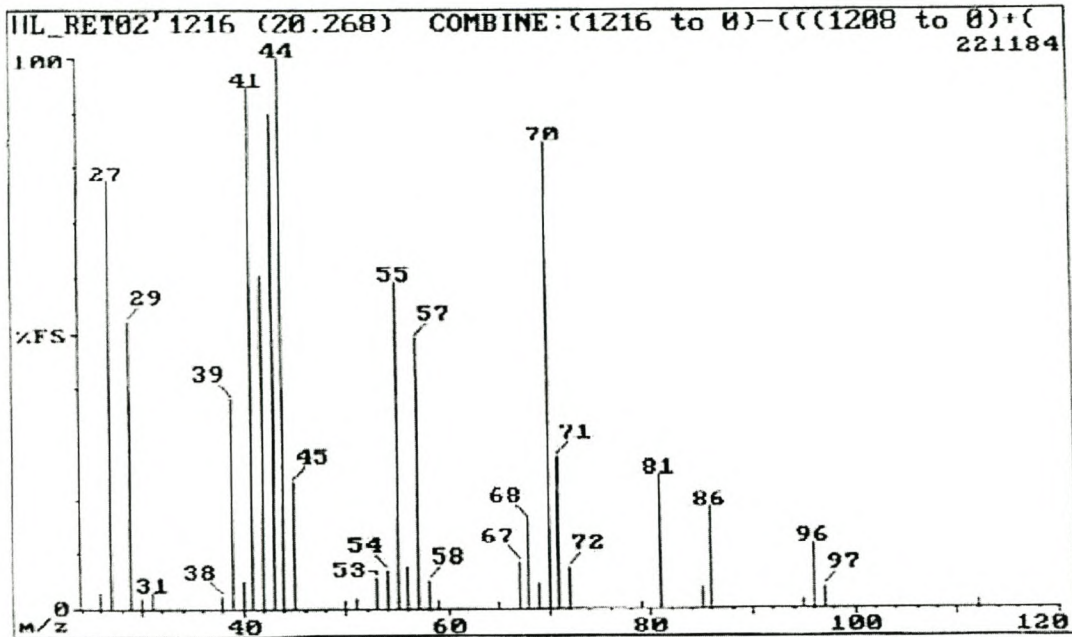
Figuur 5.2 TIC van die afskeiding van die bosluiswyfies wat deur middel van mikroglasveselpapier oplosmiddelvry in die inlaat aangebring is.



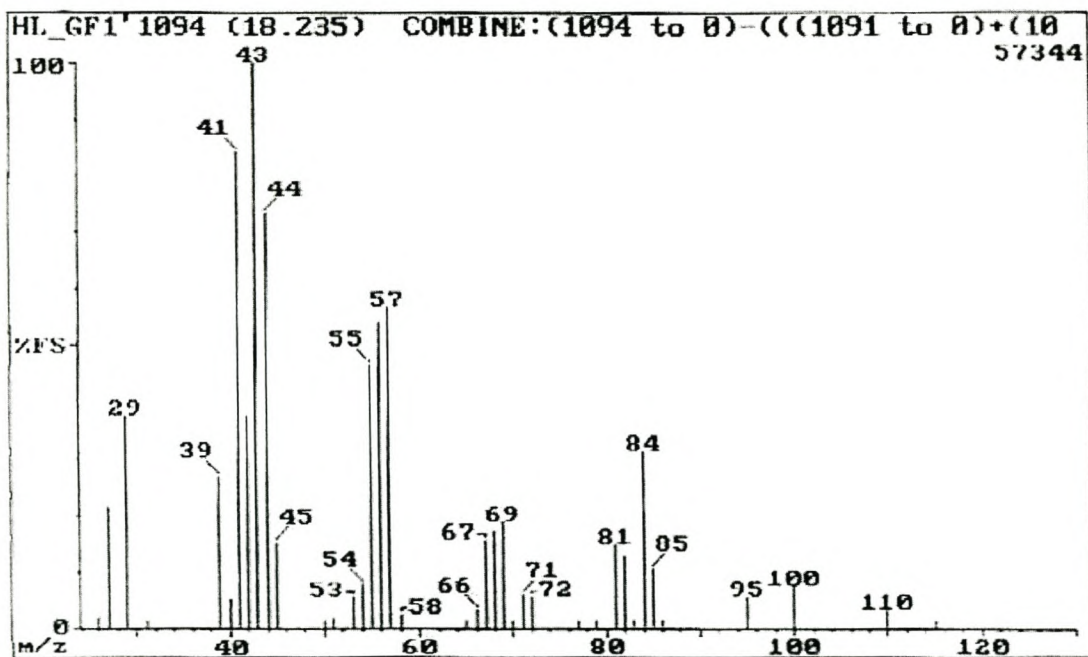
Figuur 5.3 'n Tweede TIC van die afseiding van die bosluiswyfies wat deur middel van mikroglasveselpapier oplosmiddelvry in die inlaat aangebring is.



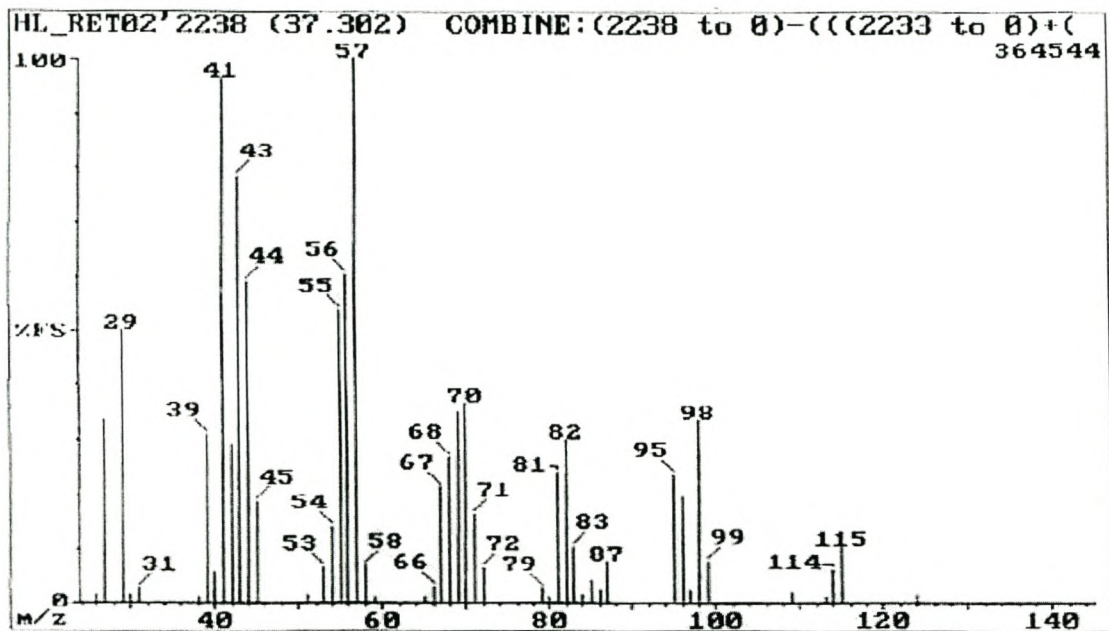
Figuur 5.4. EI massaspektrum van K398 (heksanaal).



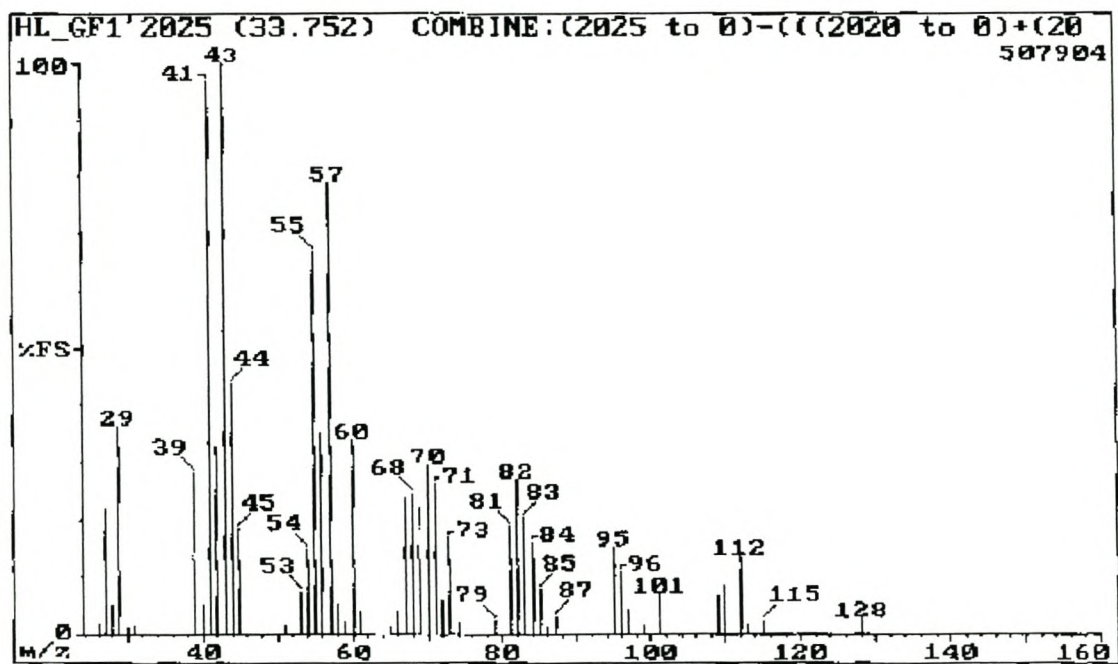
Figuur 5.5 EI massaspektrum van K1215 (heptanaal).



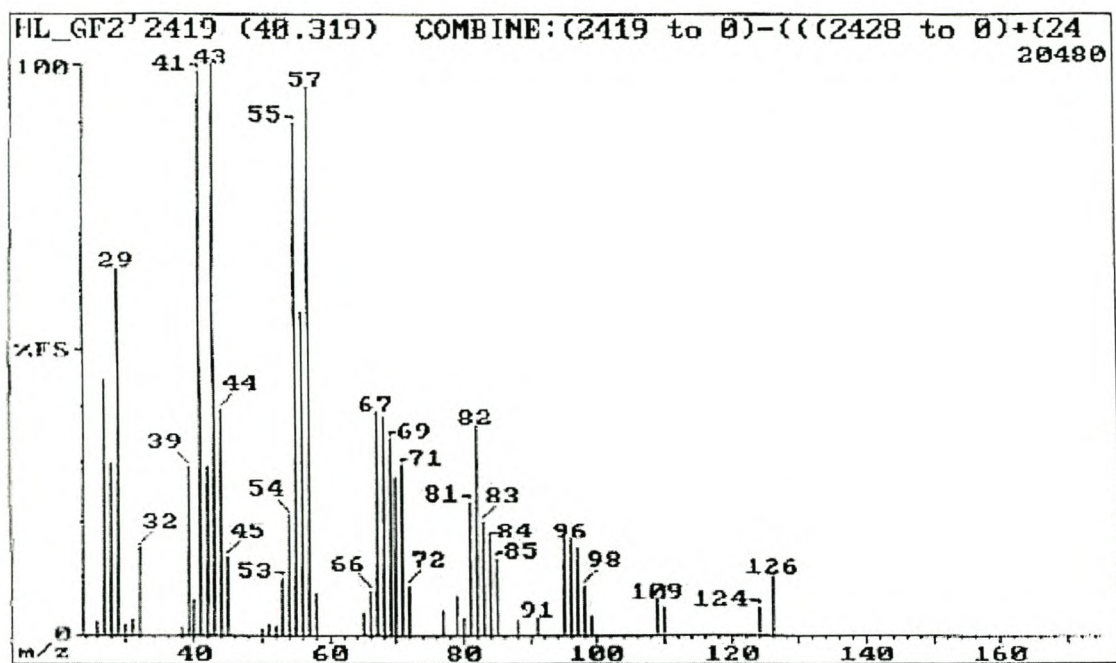
Figuur 5.6 EI massaspektrum van K1094 (oktanaal).



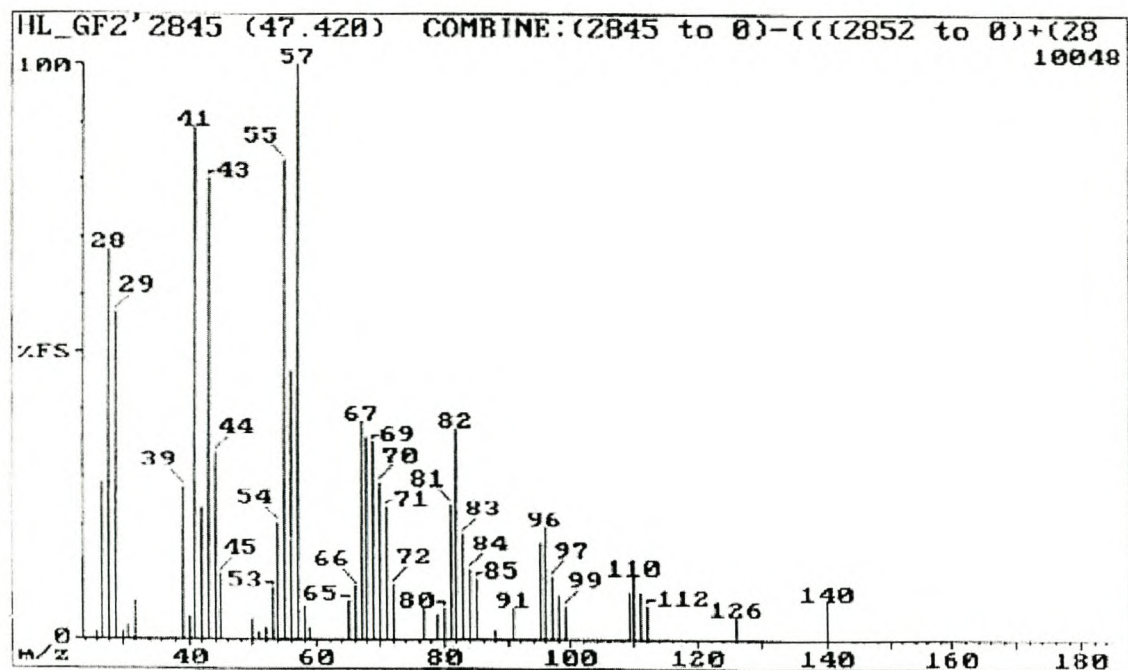
Figuur 5.7 EI massaspektrum van K2238 (nonanaal).



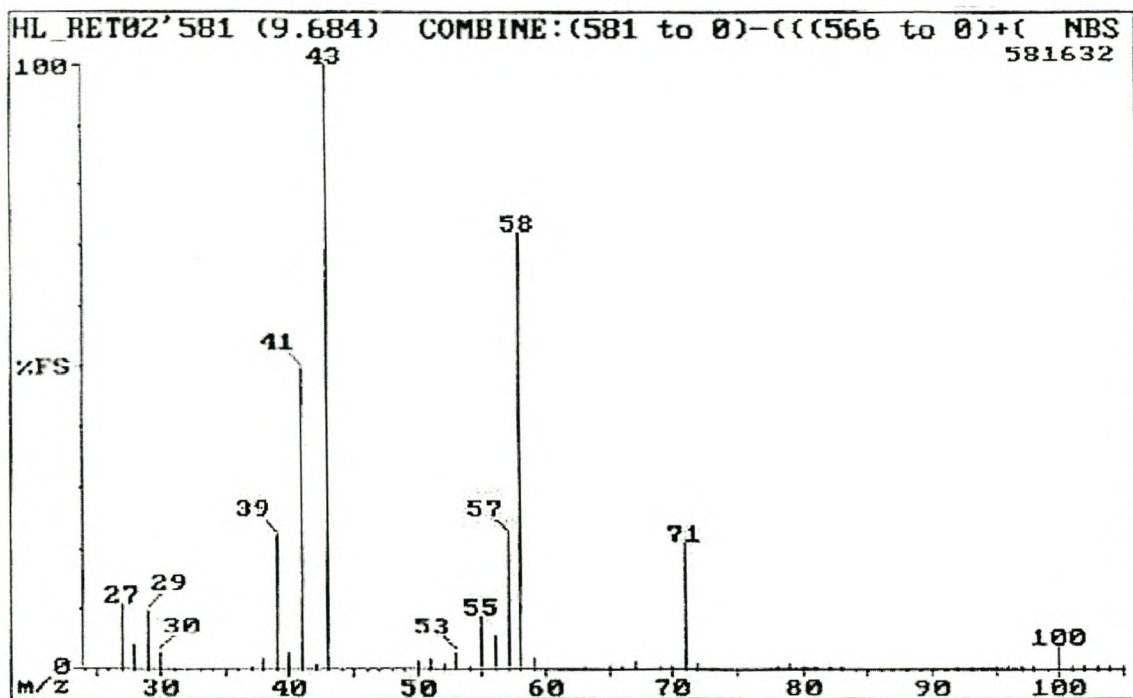
Figuur 5.8 EI massaspektrum van K2025 (dekanaal).



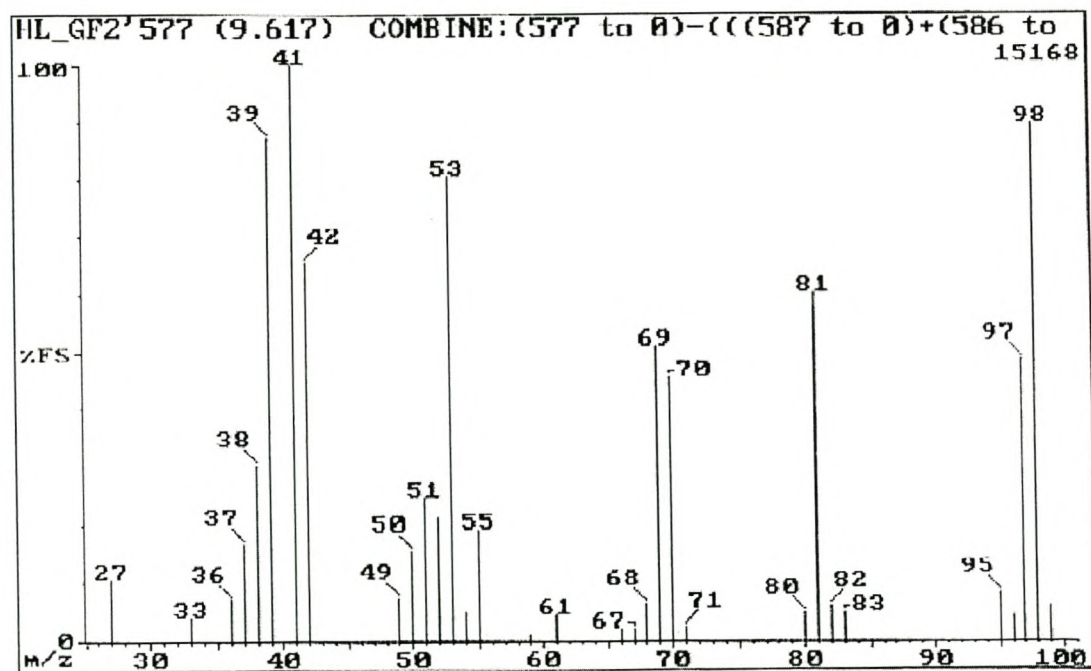
Figuur 5.9 EI massaspektrum van K2419 (undekanaal).



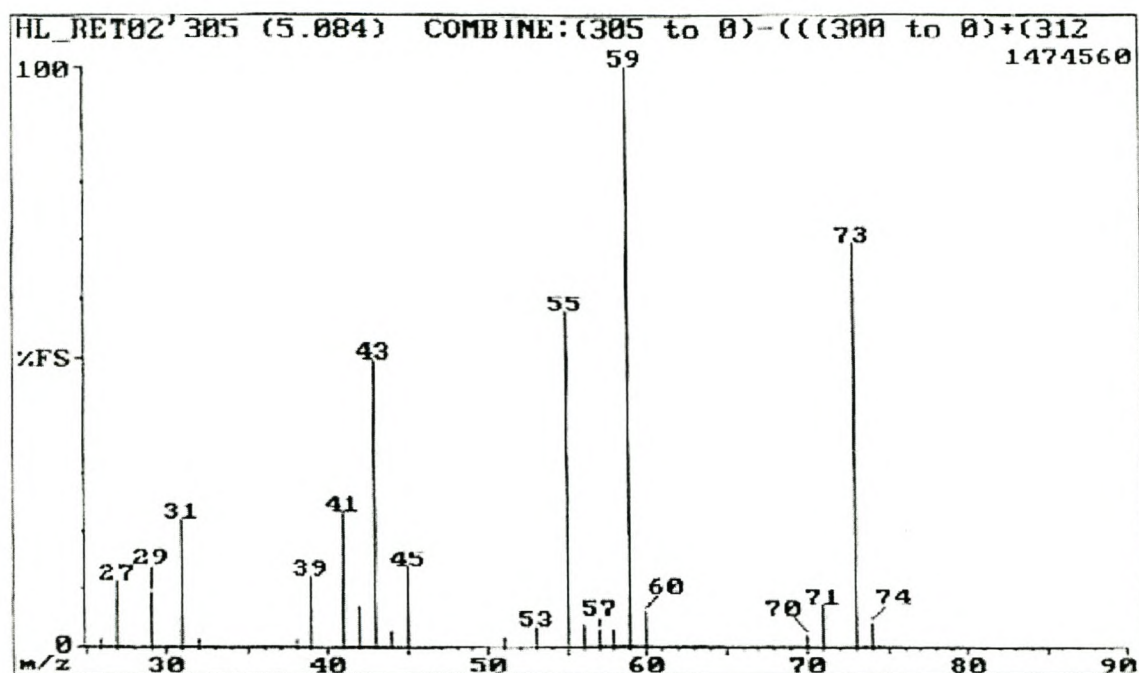
Figuur 5.10 EI massaspektrum van K2845 (dodekanaal).



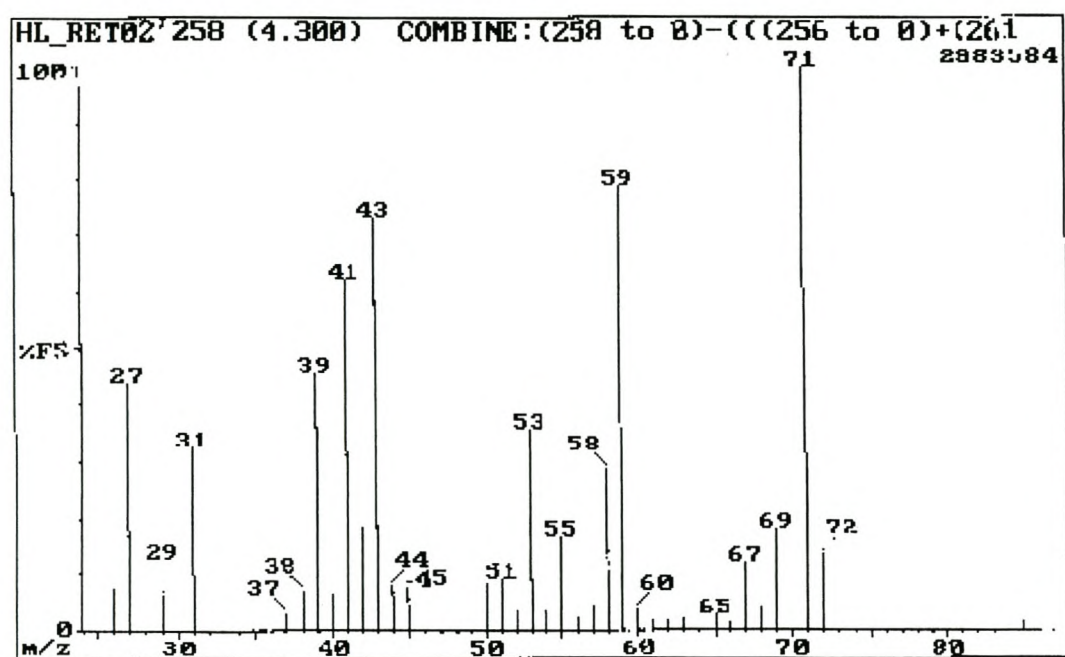
Figuur 5.11 EI masspektrum van K581 (2-metieipentanaal).



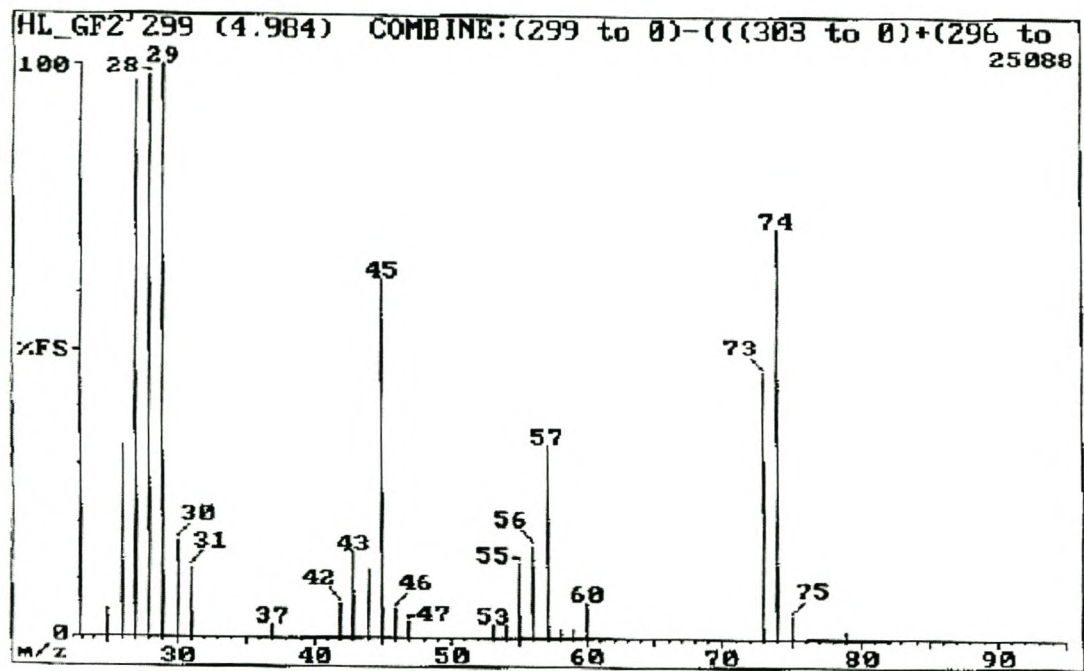
Figuur 5.12 EI masspektrum van K576 (furfurielalkohol).



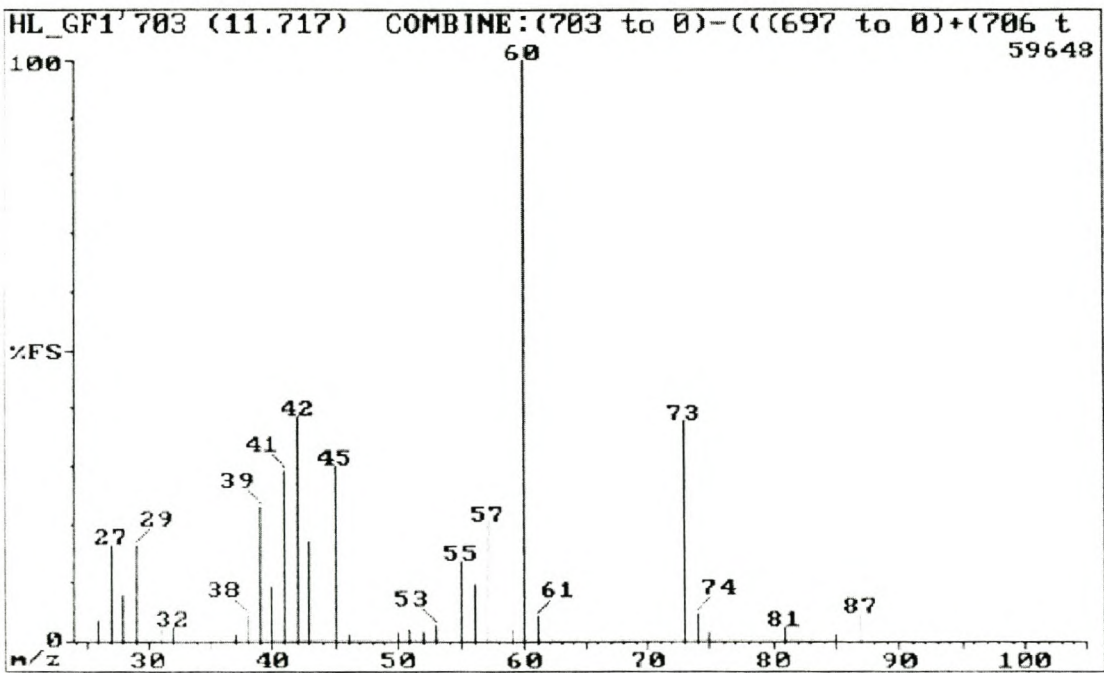
Figuur 5.13 EI massaspektrum van K307 (2-metiel-2-butanol).



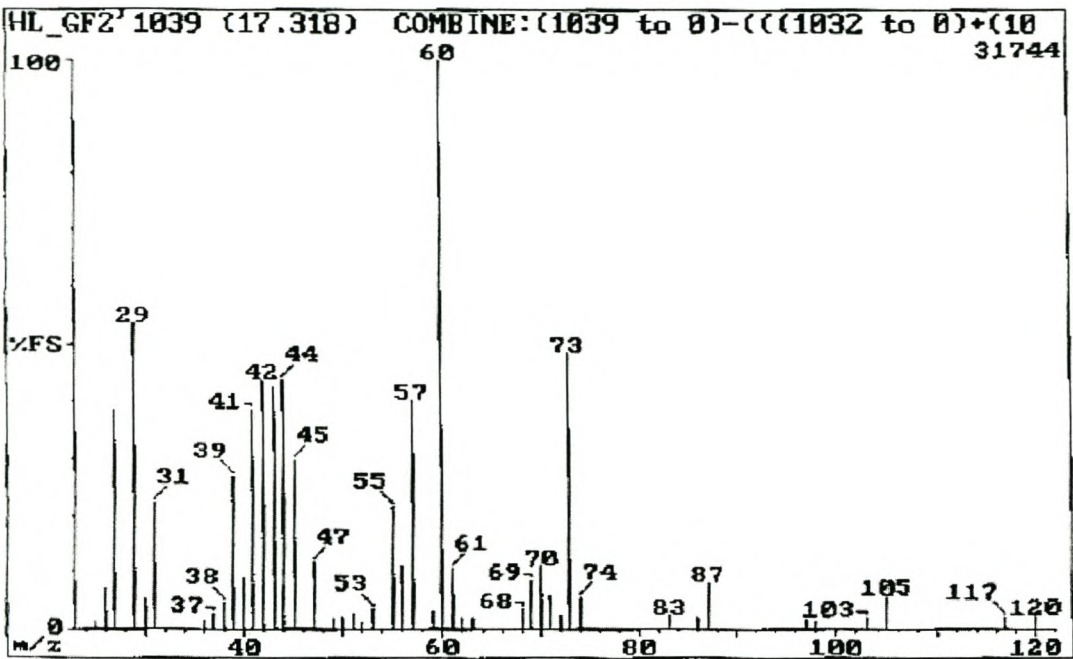
Figuur 5.14 EI massaspektrum van K258 (2-metiel-3-buten-2-ol).



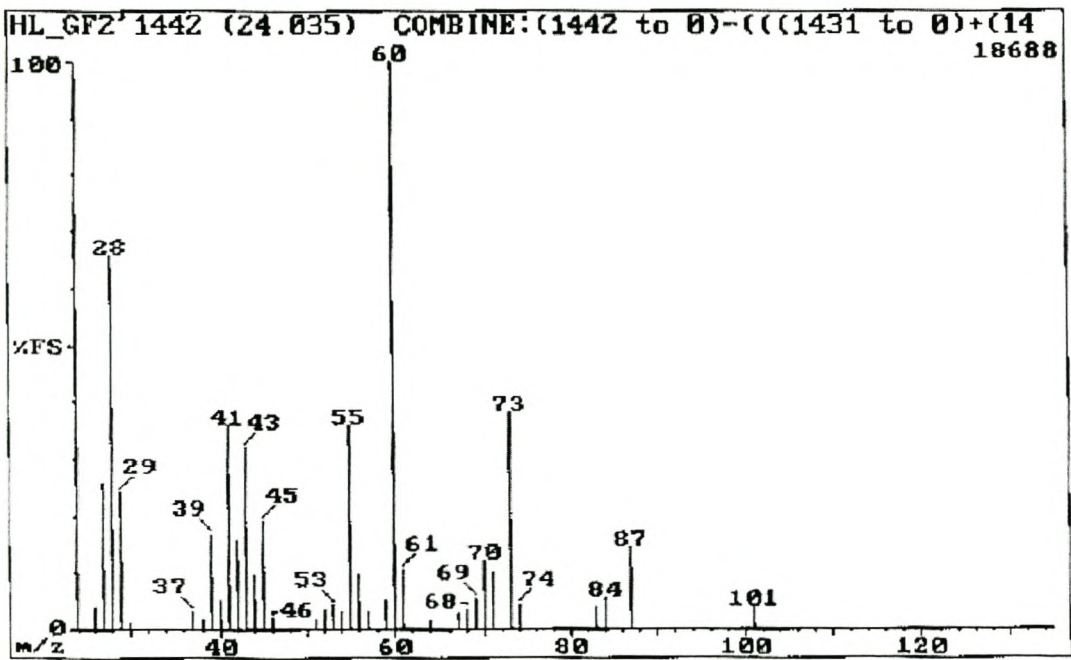
Figuur 5.15 EI massaspektrum van K298 (propanoësuur).



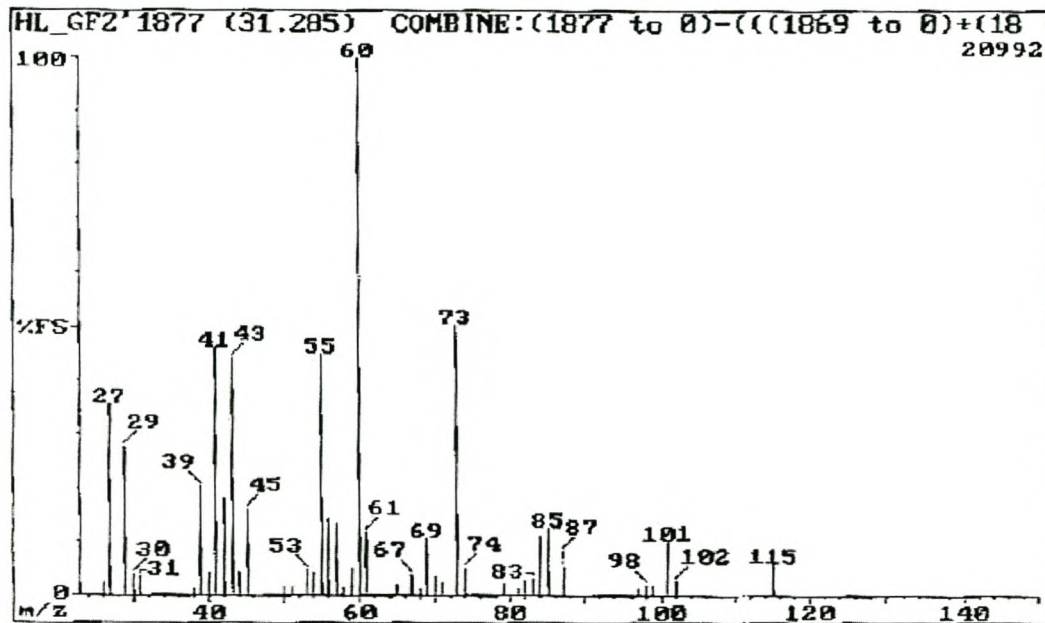
Figuur 5.16 EI massaspektrum van K703 (pentanoësuur).



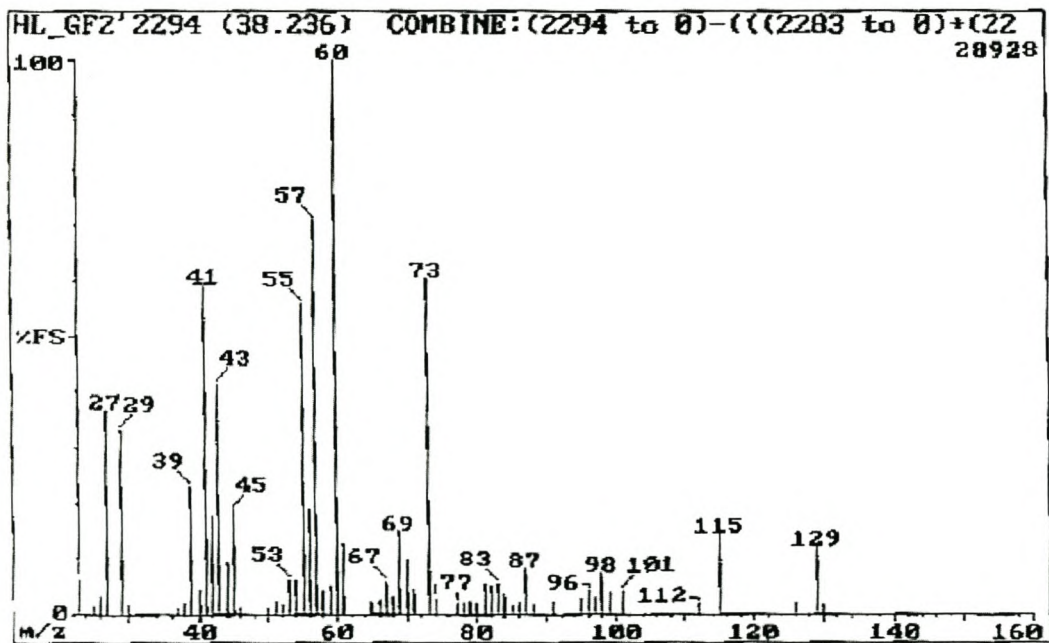
Figuur 5.17 EI massaspektrum van K1033 (heksanoësuur).



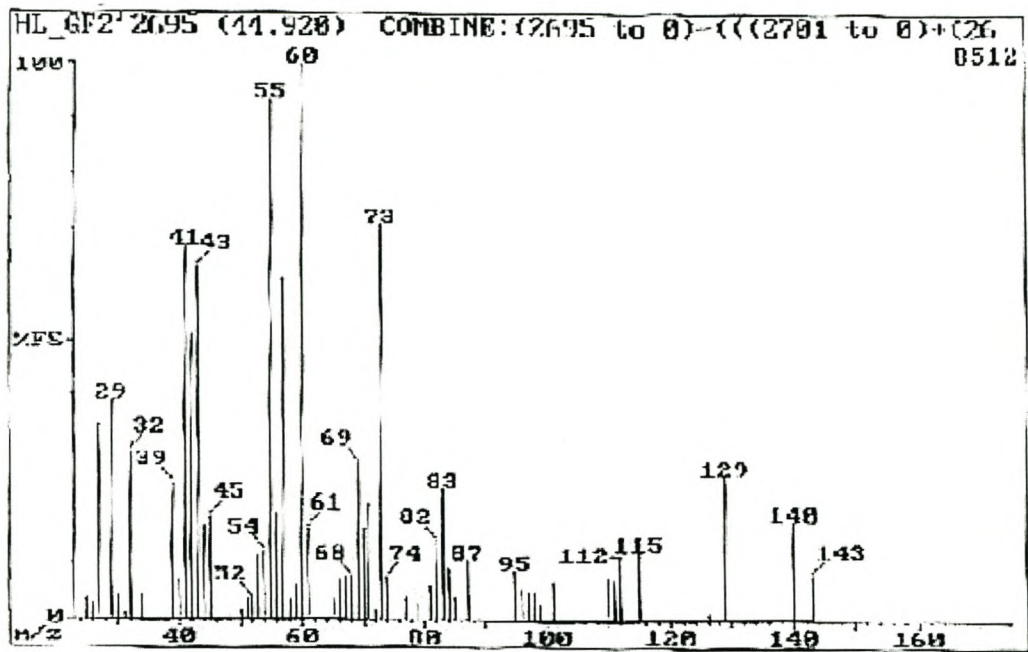
Figuur 5.18 EI massaspektrum van K1442 (heptanoësuur).



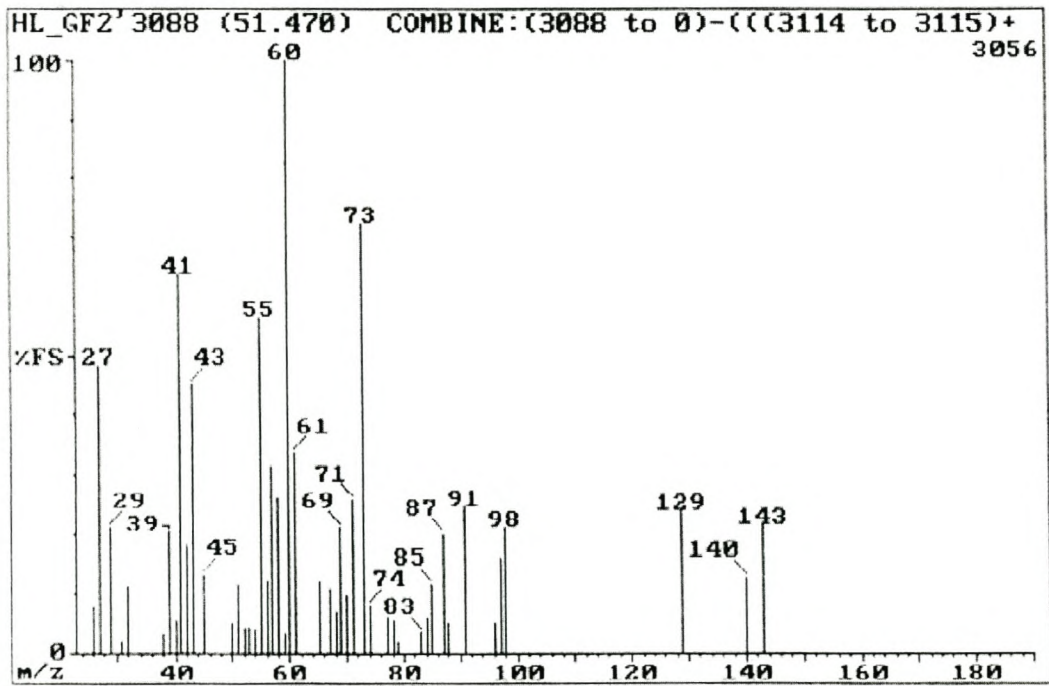
Figuur 5.19 EI massaspektrum van K1876 (oktanoësuur).



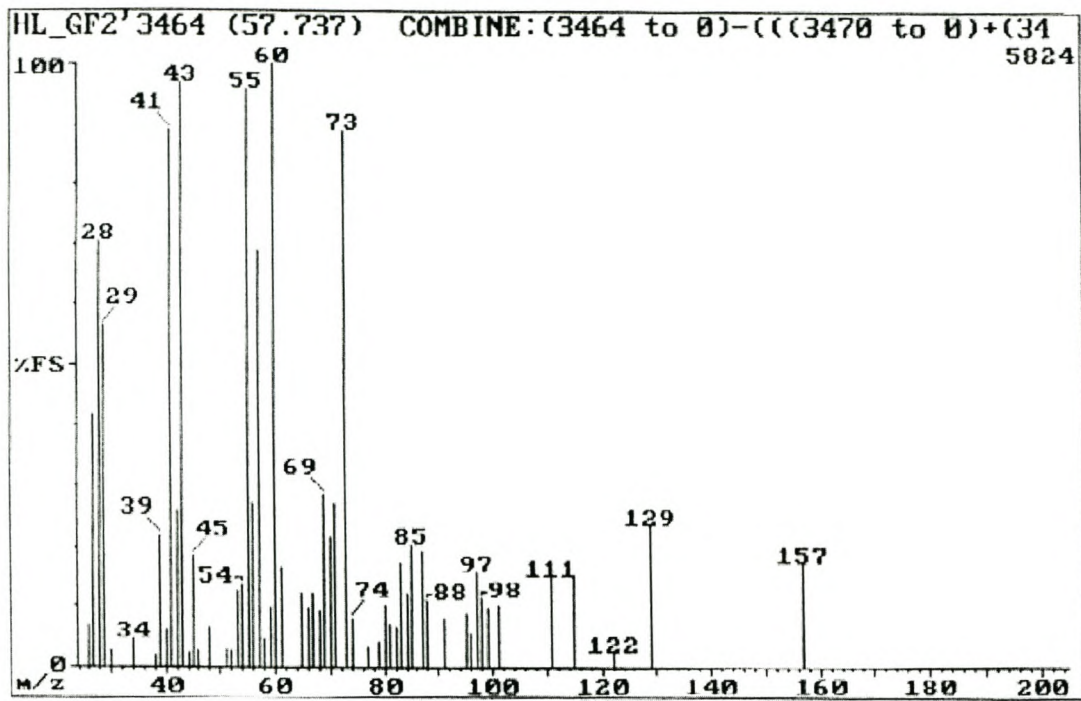
Figuur 5.20 EI massaspektrum van K2293 (nonanoësuur).



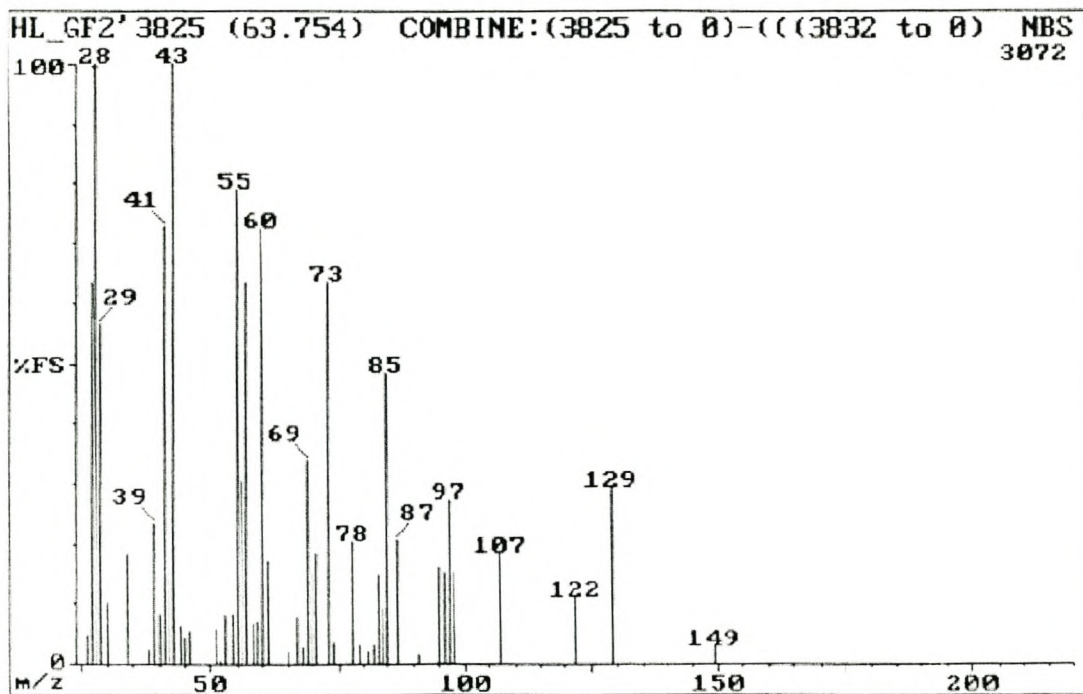
Figuur 5.21 EI massaspektrum van K2695 (dekanoësuur).



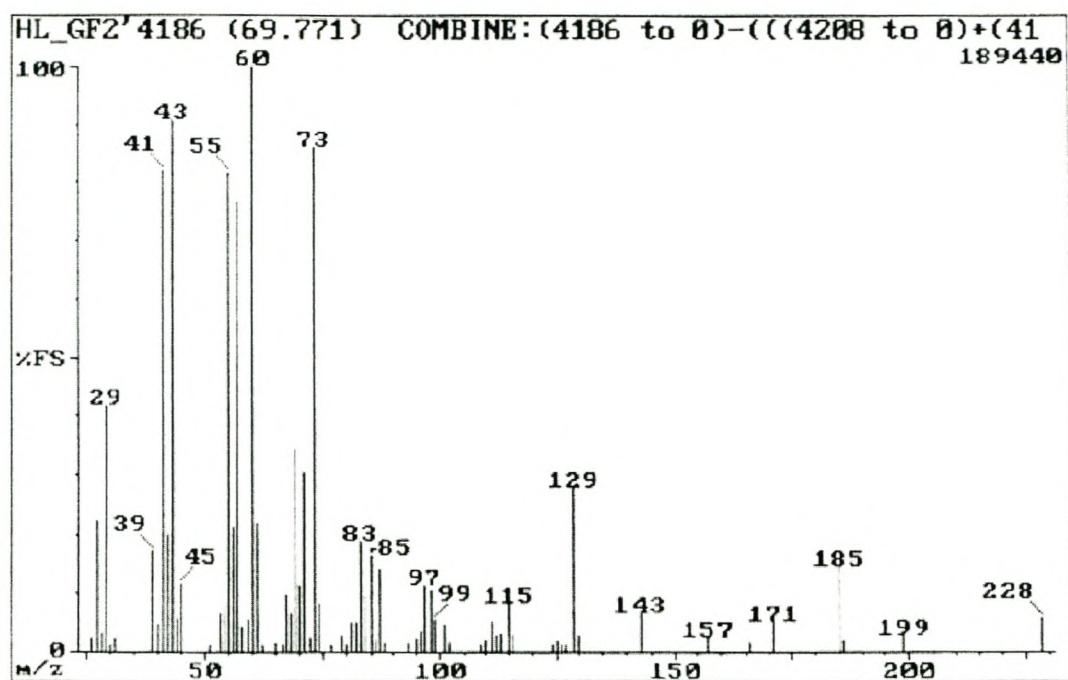
Figuur 5.22 EI massaspektrum van K3086 (undekanoësuur).



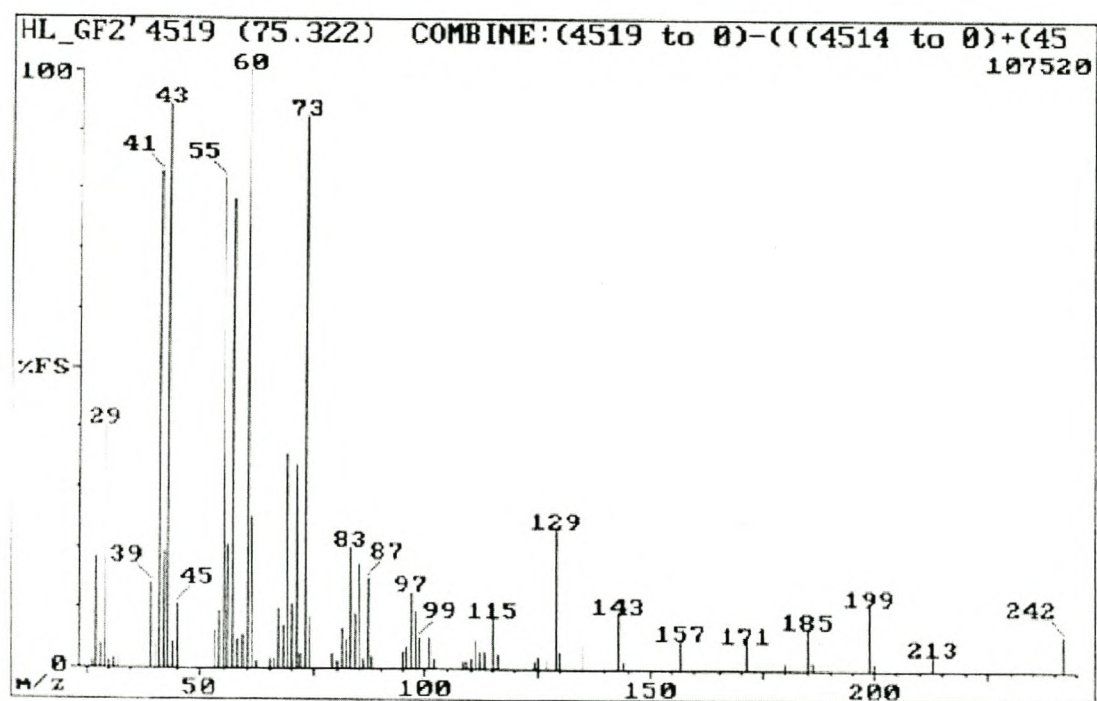
Figuur 5.23 EI masspektrum van K3464 (dodekanoësuur).



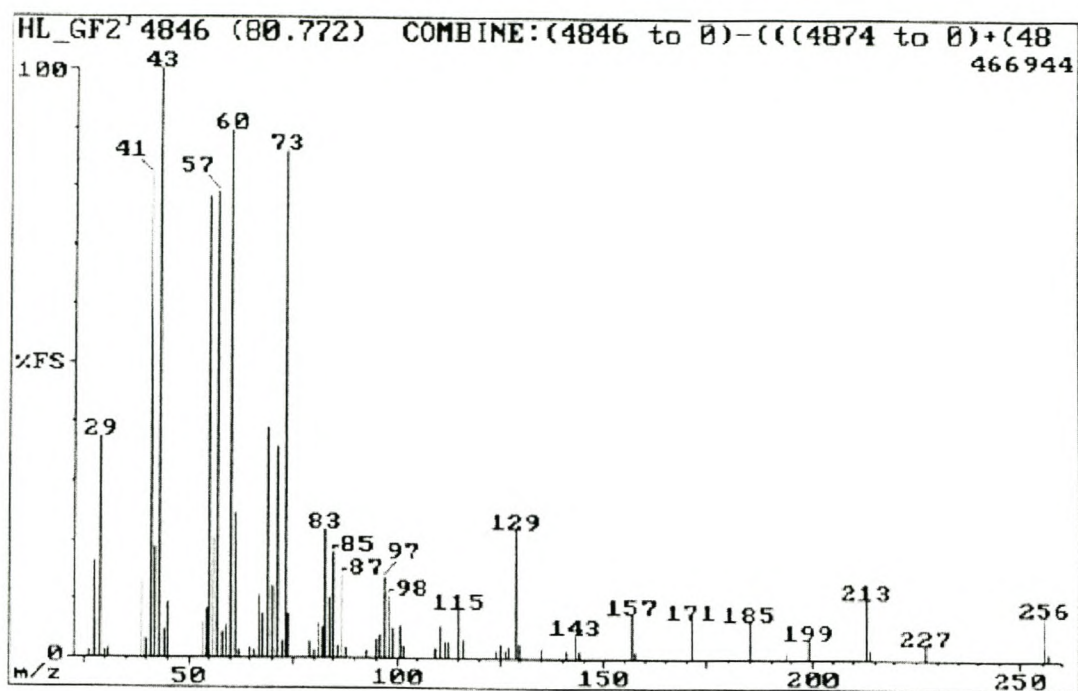
Figuur 5.24 EI masspektrum van K3825 (tridekanoësuur).



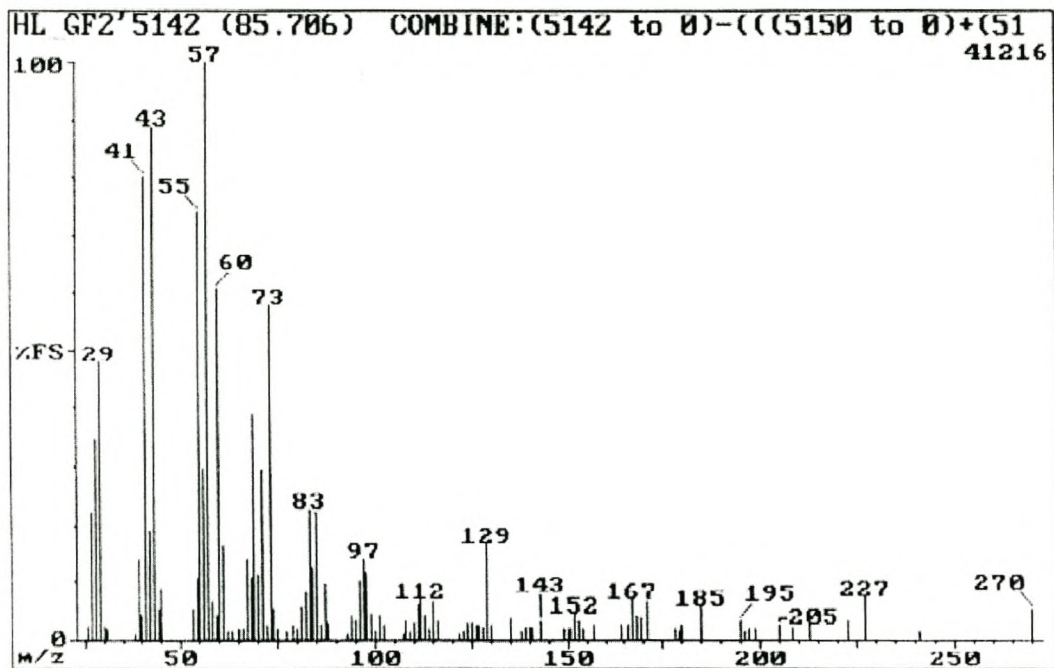
Figuur 5.25 EI massaspektrum van K4182 (tetradekanoësuur).



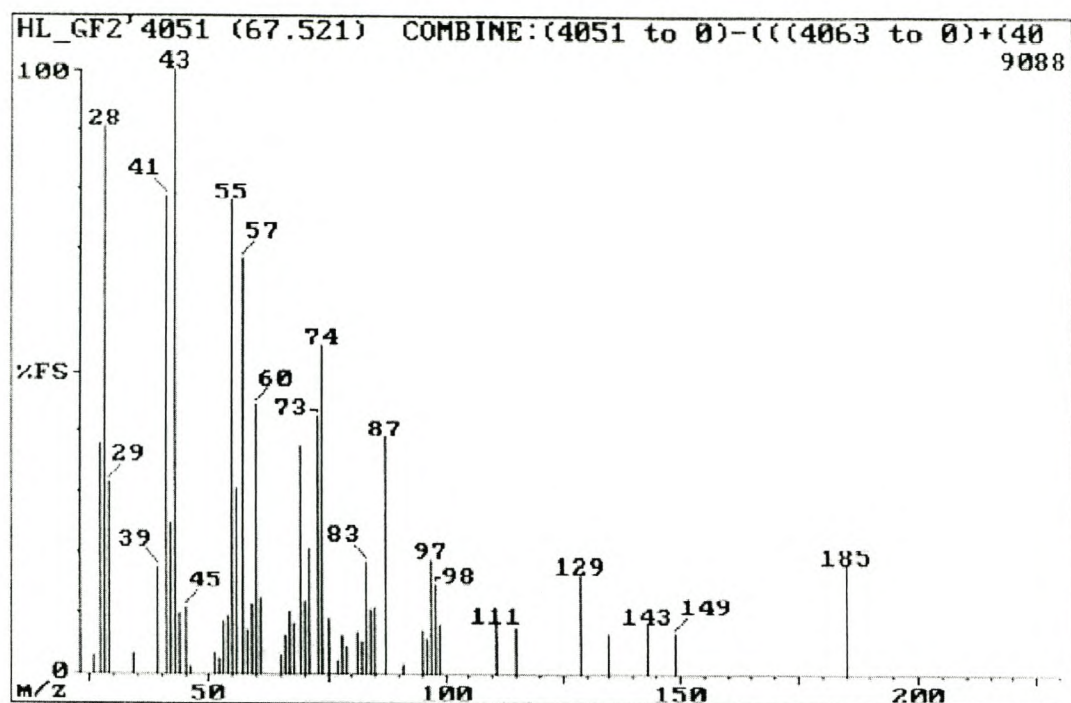
Figuur 5.26 EI massaspektrum van K4520 (pentadekanoësuur).



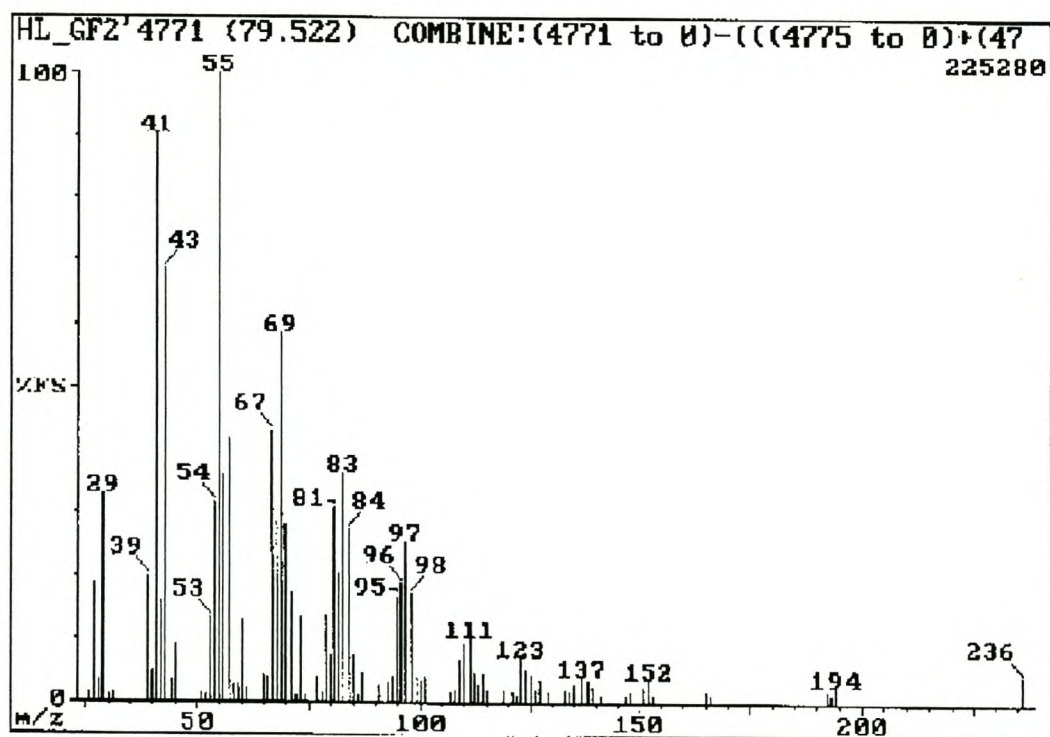
Figuur 5.27 EI massaspektrum van K4856 (heksadekanoësuur).



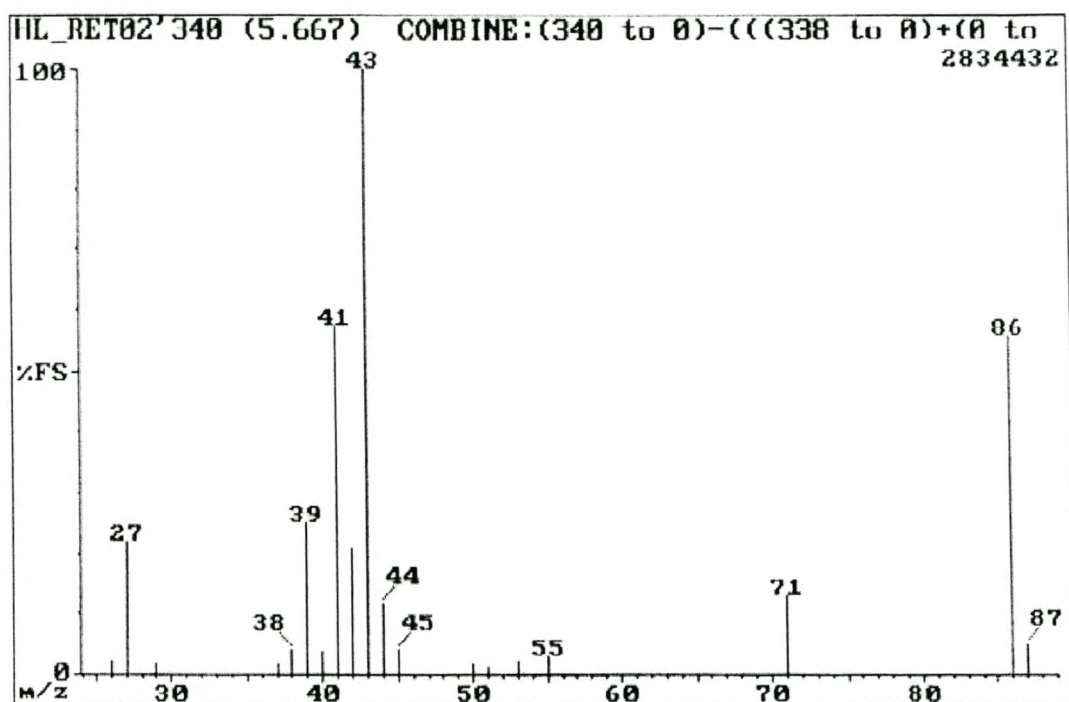
Figuur 5.28 EI massaspektrum van K5142 (heptadekanoësuur).



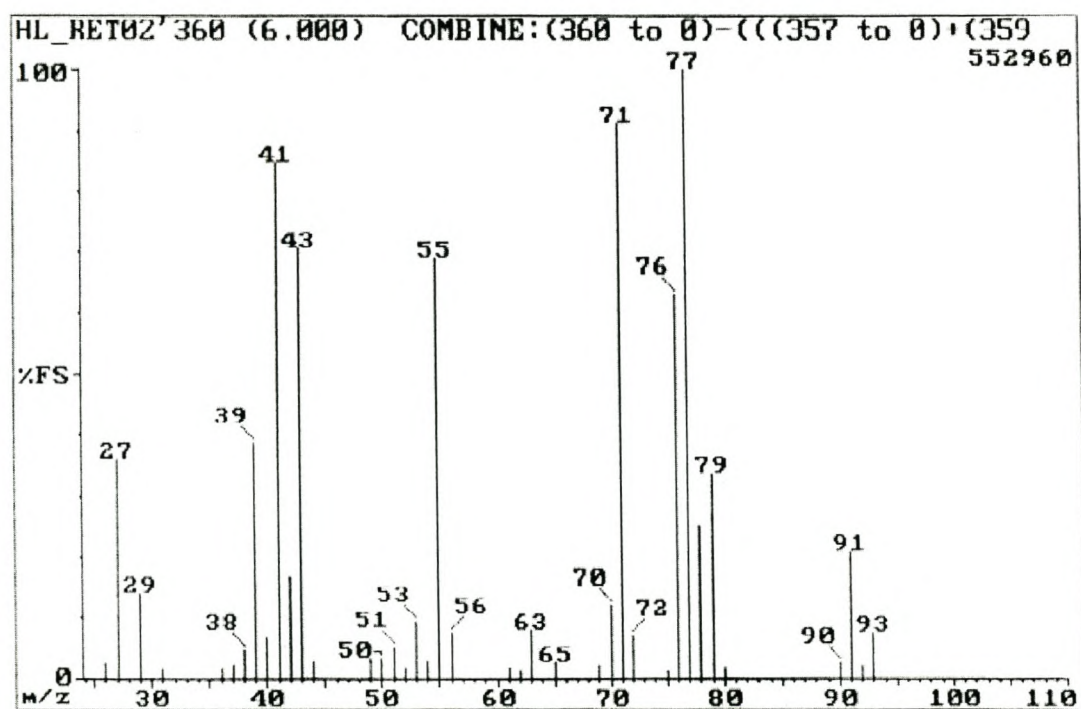
Figuur 5.29 EI massaspektrum van K4050 (ongeïdentifiseerde tetradekanoësuur)



Figuur 5.30 EI massaspektrum van K4772 (*Z*)-9-heksadekanoësuur).



Figuur 5.31 EI massaspektrum van K340 (3-metiel-2-butanoon).



Figuur 5.32 EI massaspektrum van K366 (2-chloro-2-metielbutaan).

Verwysings: Hoofstuk 5

1. H. Budzikiewicz, C. Djerassi en D.H. Williams, "Mass Spectrometry of Organic Compounds", Holden-Day, Inc., San Francisco (1967), pp. 130-133.
2. F.W. McLafferty, F. Turecek, "Interpretation of Mass Spectra", 4^e uitg., University Science Books, Sausalito, California (1993), p. 249.
3. G. Spiteller, "Interpretation of Mass Spectra Obtained from Natural Sources Especially those of Aliphatic Compounds", *Kursus aangebied by die Universiteit van Stellenbosch* (1994), p. 24.
4. A.G. Sharkey, J.L. Schultz en R.A. Friedel, *Anal. Chem.*, **28**:934 (1956).
5. A.G. Harrison, *Org. Mass Spectrom.*, **3**:549 (1970).
6. R.J. Liedke en C. Djerassi, *J. Am. Chem. Soc.*, **91**:6184 (1969).
7. D. Smit, "Olfactory Communication: Chemical Characterization of the Ventral Gland and Supplementary Sacculi Secretions of the Dwarf Hamster, *Phodopus sangorus sangorus*", Ph.D. Tesis (1997), Universiteit van Stellenbosch, Suid-Afrika, pp. 165 – 170.
8. Verwysing 1, pp. 616 – 618.
9. Verwysing 1, p. 623.
10. Verwysing 1, p. 625.
11. Verwysing 1, p. 615.
12. M.E. Rose, R.A.W. Johnstone, "Mass Spectrometry for Chemists and Biochemists", Cambridge University Press, Cambridge (1982), p. 232.
13. Verwysing 1, p. 630.
14. G. P. Happ en D. W. Stewart, *J. Am. Chem. Soc.*, **74**:4404 (1952).
15. Verwysing 1, p. 214.
16. F. W. McLafferty, "Interpretation of Mass Spectra", 2^e uitgawe, W.A. Benjamin, Inc., London, 1973, p. 142.
17. A. Maccoll, *Org. Mass Spec.*, **23**:381 (1988).
18. D. Slade, "Olfactory Communication: Chemical Characterization of the Interdigital Secretion of the Black Wildebeest, *Connochaetes gnou*", Ph.D. Tesis (2000), Universiteit van Stellenbosch, Suid-Afrika, p. 91.

19. NBS Massaspektrumbiblioteek, Lab-BaseTM R 02.01, Hampden Data Services Ltd. (1989).
20. NIST Mass Spectral Search Program, Version 1.5, Standard Reference Data Program of the National Institute of Standards and Technology (1996).
21. Wiley Registry of Mass Spectral Data, 6th Edition, John Wiley & Sons, Inc. (1994).
22. Verwysing 2, p. 248.
23. Verwysing 1, p. 132: Verwysing van J.A. Gilpin en G.O. Pritchard, *Chem. and Ind.*, 1314 (1961).
24. Verwysing 1, p. 96.
25. Verwysing 1, p. 96: Verwysing van B.G. Hobrock en R.W. Kiser, *J. Phys. Chem.* **66**:1648 (1962).
26. Verwysing 1, p. 94.
27. Verwysing 1, p. 97.
28. Verwysing 1, p. 97: Verwysing van (a) L.H. Zalkow, D.R. Brannon en J.W. Uecke, *J. Org. Chem.* **29**:2786 (1964); (b) W. Reusch en C. Djerassi, ongepubliseerde werk; (c) M. Vandewalle, N. Schamp en M. Franque, *Bull. Soc. Chim. Belges*, **75**:848 (1966).
29. F.G. Kitson, B.S. Larsen, C.N. McEwen, "Gas Chromatography and Mass Spectrometry, A Practical Guide", Academic Press (1996), pp. 57 - 58.
30. Prof. Pat Sandra, Klasnotas vir honneurskursus in Massaspektrometrie (2001), Universiteit van Stellenbosch, Suid-Afrika.
31. Verwysing 18, p. 36: Verwysing van D.J. Pasto en C.R. Johnson, "Organic Structure Determination", Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, N.J. (1969), p.272.
32. Verwysing 2, p. 240.
33. Verwysing 18, p. 37: Verwysing van L. Dolejs, P. Beran en J. Hradec, *Org. Mass Spec.*, **1**:565 (1968).
34. Verwysing 2, p. 60.
35. A.E. Nell, "Reuksintuiglike Kommunikasie: Chemiese Karakterisering van die Interdigitale en Preorbitale Afskeidings van die Bontebok, *Damaliscus dorcas dorcas* en die Blesbok, *Damaliscus dorcas phillipsi*", Ph.D Tesis, Universiteit van Stellenbosch, Suid-Afrika (1992), p. 247.
36. Verwysing 1, p. 102.

37. Verwysing 2, p. 204.
38. Verwysing 1, p. 134: Verwysing van A.G. Sharkey, J.L Shultz en R.A. Friedel, *Anal. Chem*, **28**:934 (1956).
39. Verwysing 2, p. 247.
40. Verwysing 2, p. 248.
41. Verwysing 1, p. 434 - 435.
42. Verwysing 2, p. 280.